ORSAY
n° d'ordre 2770

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

T H E S E

présentée
Pour obtenir

Le grade de DOCTEUR D'ETAT
spécialité : SCIENCES NATURELLES
PAR

Yves HENRY en collaboration avec J. DE BUYSER

SUJET : ANDROGENESE CHEZ LE BLE TENDRE - ANALYSE THEORIQUE ET UTILISATION EN SELECTION.

soutenue le vendredi 23 septembre 1983 devant la commission d'examen

MM DEMARLY Y. Président
BEN BADIS A.
CAUDERON Y.
LEVIEIL F.
MOUNOLOU J.C.
NITSCH C.

LIBRARY
ROYAL SOCIETY
LONDON

ORSAY
n° d'ordre

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

T H E S E

présentée
Pour obtenir

Le grade de DOCTEUR D'ETAT
spécialité : SCIENCES NATURELLES

PAR

Yves HENRY en collaboration avec J. DE BUYSER

SUJET : ANDROGENESE CHEZ LE BLE TENDRE - ANALYSE THEORIQUE ET UTILISATION EN SELECTION.

soutenue le vendredi 23 septembre 1983 devant la commission d'examen

MM DEMARLY Y. Président
BEN BADIS A.
CAUDERON Y.
LEVIEIL F.
MOUNOLOU J.C.
NITSCH C.

Mon collègue Jacques DE BUYSER est à l'origine de ces travaux, que nous avons développés en commun. Je tiens à le remercier pour la confiance qu'il m'a accordée, et pour l'excellent esprit de camaraderie qui l'anime. Merci Jacques.

Monsieur DEMARLY nous a accueilli au D.E.A., et dans le Laboratoire d'Amélioration des plantes. Nous y avons trouvé la liberté nécessaire pour la réalisation de ce travail, et nous ne saurions assez le remercier de nous y avoir procuré un emploi.

Madame CAUDERON et Madame NITSCH nous ont apporté leurs compétences, dans les domaines qui nous intéressent. L'aide matérielle lors de certaines expériences, la façon de percevoir les problèmes et les corrections apportées au manuscrit, méritent toute notre gratitude.

En ce qui concerne Monsieur LEVIEIL, président de l'A.D.A.R.+, nous lui sommes très reconnaissants d'avoir suivi et encouragé la progression de nos travaux de recherche.

Nous remercions Monsieur MOUNOLOU et Monsieur BEN BADIS d'avoir accepté de participer à ce jury. L'intéret qu'ils ont manifesté, et les remarques qu'ils nous ont suggéréeslors de la lecture de ce manuscrit, nous ont été très profitables.

Nous avons bénéficié de la confiance et du soutien matériel que les membres de l'A.D.A.R.+ ont accordés à ce travail. Nous tenons, à ce propos, à remercier personnellement Messieurs DESPREZ, Monsieur GAYRAUD, Monsieur MOMONT et Monsieur BRICOUT, sans lesquels ces travaux n'auraient pu être menés à bien.

Messieurs LAUR, LONNET et HERTZOG sont directement impliqués dans ce travail, auquel ils ont apporté leur contribution. Nous les en remercions.

L'électrophorèse des gliadines a été réalisée par Madame LEBRUN, dans les laboratoires de l'I.T.C.F.. Ses remarques et ses précisions nous ont beaucoup aidé.

Au cours de vives et enrichissantes discussions, Christian RAQUIN a su nous fournir des informations intéressantes. Ses compétences, sa disponibilité et son aide sans réserve nous ont beaucoup apporté. Merci Christian.

Les travaux de Monsieur AMSSA et de Mademoiselle TALEB ont amené de très importants résultats. Nous ne saurions les passer sous silence.

Thierry GUENEGOU, puis Claudine ORY nous ont apporté une assistance efficace. Leur disponibilité, leur patience et leur gentillesse nous ont été très précieuses. Leur dévouement a permis d'alléger notablement notre tâche.

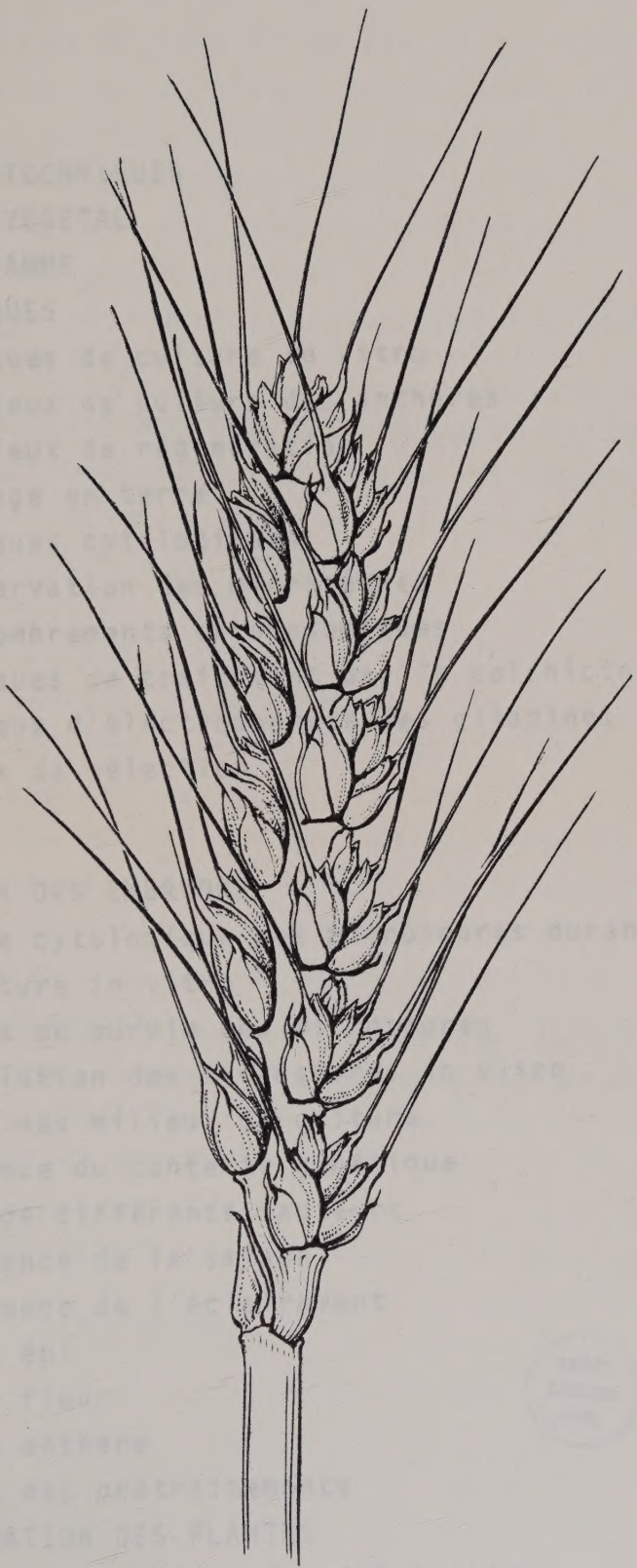
Nous ne pouvons passer sous silence l'ambiance de chaude cordialité que ces collègues et bien d'autres ont contribué à faire régner, et sans laquelle ces travaux n'auraient pu être menés à bien.

Remercions aussi celui qui m'a enseigné la culture d'anthères, je veux parler de Georges PELLETIER, dont les conseils se sont toujours révélés précieux.

Nos remerciements vont aussi à tous les membres du Laboratoire d'Amélioration des plantes, et d'ailleurs, qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ces travaux et de ce mémoire.

Yves HENRY

+ A.D.A.R. : Association pour le Développement des Applications de la Recherche en Amélioration des Plantes. Fondée en 1975, par un groupe d'Etablissements de sélection comprenant les Sociétés CLAUSE, DESPREZ et R.A.G.T., ainsi que l'I.R.A.T. (Institut de Recherches Agronomiques Tropicales) et le GIE de l'I.T.C.F. (Institut Technique des Céréales et des Fourrages). Les membres fondateurs ont ouvert l'association à d'autres établissements. L'A.D.A.R. comprend actuellement plus de 30 membres.



P L A N

- GLOSSAIRE p. 3

- INTRODUCTION p. 6

- MATERIEL ET TECHNIQUES p. 13
  I. MATERIEL VEGETAL
  II. ORGANIGRAMME
  III. TECHNIQUES
    1) Techniques de culture in vitro
       a- Milieux de culture des anthères
       b- Milieux de régénération
    2) Repiquage en terre
    3) Techniques cytologiques
       a- observation des microspores
       b- dénombrements chromosomiques
    4) Techniques de traitement par la colchicine
    5) Technique d'électrophorèse des gliadines
    6) Travaux de sélection

- RESULTATS p. 19
  I. OBTENTION DES EMBRYONS p. 21
    A. Analyse cytologique des microspores durant la culture in vitro p. 22
       a) Taux de survie des microspores
       b) Evolution des microspores in vitro
    B. Effets des milieux de culture p. 33
    C. Influence du contexte génétique p. 40
    D. Etude de différents facteurs p. 43
       -Influence de la saison
       -Influence de l'éclairement
       -Effet épi
       -Effet fleur
       -Effet anthère
       -Effet des prétraitements
  II. REGENERATION DES PLANTES p. 56
    a) Influence du milieu de régénération
    b) Influence de la qualité et de l'âge des embryons

c) Influence du contexte génétique
d) Influence du niveau de ploïdie
e) Les plantes albina

III. NIVEAUX DE PLOIDIE ET OBTENTION DES SEMENCES p. 68
a) Détermination du niveau de ploïdie
b) Origine des diploïdes spontanés
c) Traitement des plantes haploïdes par la colchicine
d) Fertilité des haploïdes doublés et de leur descendance
e) Anomalies chromosomiques
f) Descendance aneuploïde d'un haploïde doublé spontané de la variété Atys

IV. INTERET DES HAPLOIDES DOUBLES EN SELECTION p. 93
A. Observations réalisées durant les générations de multiplication p. 94
a) Homogénéité et stabilité
b) Sélection
B. Valeur agronomique p. 97
a) Valeur des HD par rapport à leurs parents
b) Valeur des HD et des lignées "classiques" issues des mêmes croisements
c) Valeur des HD par rapport aux témoins officiels
C. Variabilité observée après androgenèse p.103
a) Variabilité des HD obtenus à partir de F_1, F_2 et BC_1
b) Variabilité des HD provenant de générations avancées et de systèmes de sélection différents
c) Variabilité des HD provenant de variétés
D. Gain de temps par rapport à la sélection traditionnelle p.116
E. Utilisation des HD p.116
a) Analyses génétiques
b) Utilisation en sélection

- DISCUSSION - CONCLUSION p.122

- ANNEXES

GLOSSAIRE

Par esprit de simplification, il nous a semblé nécessaire de définir quelques uns des termes les plus couramment utilisés dans ce texte :

ANDROGENESE : Développement d'un embryon haploide ou diploide spontané à partir du noyau du gamétophyte mâle (DE FOSSARD 1974 GUELPH)

GYNOGENESE : développement d'un embryon haploide ou diploide spontané à partir d'un noyau du gamétophyte femelle.

ORIGINES : Génotypes (F_1) ou ensembles de génotypes (F_2 à F_8) utilisés comme matériel fournissant les anthères mises en culture.

HAPLOIDE (n) : Cellules et plantes possédant le nombre gamétique de chromosomes de l'espèce (DE FOSSARD 1974 Guelph, 403-410).

DIPLOIDE (2n) : Cellules et plantes possédant deux fois le nombre gamétique de chromosomes de l'espèce (DE FOSSARD 1974 Guelph, 403-410).

TETRAPLOIDE (4n) : Cellules et plantes possédant 4 fois le nombre gamétique de chromosomes.

HAPLOIDE DOUBLE (HD) : Plante androgénétique possédant deux fois le nombre gamétique de chromosomes de l'espèce, par suite d'un doublement spontané ou induit par le traitement à la colchicine.

DIPLOIDE SPONTANE : Plante ou embryon à 42 chromosomes provenant du doublement spontané de microspores haploides (n = 21).

LIGNEE HD : Descendance par autofécondation d'un haploide doublé.

EPI (OU ANTHERE) EMBRYOGENE : Epi (ou anthère) ayant produit au moins un embryon.

EMBRYON : Toute structure qui du point de vue morphologique ressemble à un embryon et se développe comme un embryon sensu stricto, sans avoir à préciser si aucun, un seul ou les deux gamètes sont en cause (DE FOSSARD 1974, Guelph 403-410). Par embryon sensu stricto, nous entendons une structure bipolaire, dont les parties caulinaires et racinaires sont en continuité.

REGENERATION : Nous avons utilisé ce terme, plutôt que celui de germination, dans la mesure où tous les embryons n'ont pas une morphologie normale. Par ailleurs, certains embryons produisent une plante à plusieurs talles. Il pourrait s'agir de développements secondaires, à partir du scutellum.

MILIEUX DE CULTURE : Il s'agit de l'ensemble des constituants chimiques nécessaires pour obtenir l'embryogenèse à partir des microspores cultivées dans les anthères.

GLIADINES : Protéines contenues dans le grain.

NA : nombre d'anthères cultivées.

NE : nombre d'embryons obtenus.

NPC : nombre de plantes chlorophylliennes régénérées.

NPA : nombre de plantes albina régénérées.

2,4-D : acide 2-4 dichlorophénoxyacétique.

AIA : acide indolacétique.

SCHEMAS DE SELECTION : Ils ont comme point de départ un matériel hybride.

Sélection généalogique : dans sa parcelle F_2, le sélectionneur ne retient que quelques plantes qui lui semblent particulièrement intéressantes. Les descendances de ces plantes constituent, dans les pépinières, les familles F_3, parmi lesquelles seront sélectionnés les individus qui possèdent les caractères recherchés. Lors de chaque génération d'autofécondation, certaines familles sont abandonnées. En général, dès la F_5, le sélectionneur procède à des essais de comportement puis de rendement, tout en poursuivant l'homogénéïsation des lignées intéressantes jusqu'en F_{10}.

Bulk : Le principe consiste à différer la sélection généalogique, afin de ne pas éliminer précocement des plantes dont la descendance pouvait présenter un intérêt. Ainsi, la parcelle F_2 est soumise à une pression de sélection pour

certains caractères. La répétition du processus permet d'aboutir, à effectif constant, à une population dans laquelle la fréquence des caractères recherchés est augmentée. A partir de la F_5 par exemple, le sélectionneur choisit dans sa parcelle les individus les plus intéressants, qui serviront de point de départ à une sélection de type généalogique.

SSD (Single Seed Descent) : Cette technique consiste, à partir d'une F_2, à ne conserver, dans la descendance de chaque plante, à chaque génération, qu'un seul individu tiré au hasard. Ce processus, répété une dizaine de fois, permet d'atteindre une homozygotie satisfaisante. La sélection ne s'effectue que lorsque l'on dispose de génotypes fixés, en nombre égal, pour un croisement donné, au nombre de plantes F_2.

Trois Céréales - Blé, Riz, Maïs - constituent la base alimentaire des populations du globe :
- le Blé a vu son importance croître durant le développement de la civilisation indo-européenne; c'était la céréale des peuples occidentaux sous climat tempéré.
- le Maïs était un élément important des anciennes civilisations d'Amérique centrale, sous des climats tropicaux et sub-tropicaux.
- le Riz se rencontre au berceau des vieilles civilisations de l'est de l'Asie; c'est la céréale des pays tropicaux soumis au régime des Moussons.

L'importance relative de ces céréales ressort des chiffres suivants qui expriment en millions de quintaux les productions approximatives mondiales actuelles de 1980 (FAO statistics) :

Blé : 4.450
Maïs: 3.920
Riz : 4.000

Et, parmi les produits alimentaires échangés par le commerce international, les céréales occupent le premier rang. Par ailleurs, certains politiciens n'hésitent pas à déclarer que les richesses alimentaires représentent une nouvelle forme de puissance. Aussi n'est-il point besoin d'insister davantage sur l'intérêt que présente la culture du Blé.

C'est durant la préhistoire, au pléistocène, que débute le processus de spéciation qui conduit au Blé actuel. Le Blé tendre, TRITICUM aestivum L. Tell.ssp vulgare MK, possède 42 chromosomes. L'étude de croisement entre différentes espèces des genres TRITICUM et AEGILOPS, a permis de mettre en évidence l'existence de trois génomes de base : A, B et D homéologues et provenant d'espèces diploïdes (2n = 14). Il a été démontré que le génome A provient de TRITICUM monococcum L.. Le génome B aurait été apporté par un AEGILOPS de la section sitopsis, probablement AEGILOPS speltoïdes Tausch.. Quand au dernier génome, D, il provient d'AEGILOPS squarrosa L. Ainsi, le Blé tendre cultivé est une espèce allohexaploïde segmentaire (2n = 6x = 42) de formule génomique AABBDD. Les chromosomes de ces trois génomes ont conservé une certaine similitude dans l'arrangement linéaire de leurs gènes, mais la mise en place de systèmes de diploïdisation les empêche de

s'associer à la méiose. Un gène (Ph) localisé sur le bras long du chromosome 5B, et découvert simultanément par OKAMOTO (1957) et RILEY (1958), limite l'appariement aux seuls chromosomes homologues.

La culture des Blés est très ancienne et date du Néolithique. Les peuples indo-européens ont consommé plusieurs espèces du genre Triticum. La station mésolithique du Mas d'Azil, en Ariège, a fourni des grains de Blé (TRITICUM dicoccum) datant des 8e et 7e millénaires. Un grand nombre de gisements néolithiques montrent que les hommes de l'âge de pierre récent utilisaient le Blé.

Il a été également prouvé que, 2500 ans avant J.C. le Blé était cultivé en Chine, et c'est de la même époque que datent certains tombeaux égyptiens, dans lesquels des grains de Blé étaient déposés près des sarcophages.

Les historiens de l'Antiquité décrivent en détail la culture du Blé dans le Proche-Orient dont les civilisations accordaient une place particulièrement importante à trois plantes : Le Blé, la Vigne et l'Olivier. Demeter chez les Grecs, puis Ceres chez les Latins déifiaient la céréale. Le Blé a été introduit en Europe Occidentale par deux voies : la voie danubienne et la voie méditerranéenne. Les Gaulois auraient appris à cultiver le Blé à l'occasion des expéditions qui les conduisirent jusqu'en Asie. Au temps des conquêtes de Jules César, la Gaule produisait du Blé en abondance. Une machine servait à la récolte des épis, il s'agit de la moissonneuse de TREVISES, dont une reconstitution existe au Conservatoire National des Arts et Métiers. Les Celtes sont aussi les inventeurs de la charrue à roue.

Il n'est pas dans notre intention de suivre dans ses détails le rôle particulier du Blé dans le développement de l'Agriculture. Plante alimentaire de première importance, le Blé fut de tous temps la plante soignée entre toutes, venant après la jachère travaillée et fumée. Toutes les causes de non-réussite ou de destruction des cultures étaient des catastrophes entraînant parfois d'épouvantables famines.

C'est surtout au XIXème siècle, avec l'avènement de l'industrie que les problèmes liés à la culture du Blé prirent un caractère intercontinental. A cette époque, des pays neufs,

défrichés par les émigrants, s'ouvrent à la culture du Blé : ce sont les Etats-Unis, le Canada, l'Australie, l'Argentine et la Nouvelle-Zélande qui deviennent rapidement pays exportateurs. Cet afflux de Blé provoque de rudes soubresauts en Europe où la production était plus coûteuse.

Après la première guerre mondiale, l'accroissement de la production augmente dans des proportions considérables et à partir de 1925 on reconstitue les réserves. Puis ce fut la grande crise économique d'origine surtout agricole. Chaque pays prend des dispositions pour son propre compte (en France : création de l'Office National du Blé en 1936). L'accumulation de stocks qui avaient presque disparus pendant la seconde guerre mondiale devait reprendre une dizaine d'années après. Cependant ces dernières années, on assiste à un meilleur équilibre entre production et demande.

La culture du Blé en France, pays producteur et exportateur, est caractérisée au cours des cent dernières années par une diminution des surfaces emblavées cependant que la production n'a cessé d'augmenter. Ainsi, vers 1875-1880, 7 millions et demi d'hectares étaient cultivés en Blé et produisaient près de 80 millions de quintaux. Actuellement, la superficie consacrée à cette culture ne représente plus que 4 millions d'hectares alors que la production a dépassé 200 millions de quintaux. Cet accroissement considérable de la production est lié à une augmentation de la productivité. Si le rendement n'a que peu évolué au cours des 50 premières années de ce siècle -de 13 qx/ha en 1910 à environ 20 qx/ha en 1956-, il n'en fut pas de même au cours des 25 dernières années : ainsi, actuellement le rendement par hectare est de l'ordre de 50 quintaux. Cette plus forte productivité est liées à de nombreux facteurs : abandon des terres peu favorables au Blé, amélioration des techniques culturales par utilisation de machines de plus en plus perfectionnées, emploi d'engrais et de produits pesticides, et enfin sélection de variétés de plus en plus productives. Notons que 30 % de la collecte sont utilisés pour la panification, la partie restante est destinée à l'alimentation animale.

Chez le Blé, plante autogame, toutes les techniques de sélection visent à fournir aux agriculteurs des variétés supérieures, au caractères fixés et présentant de nouvelles caractéristiques intéressantes (productivité, qualité du grain, résistance aux parasites etc..) par rapport aux variétés existantes. La nécessité de fournir un matériel parfaitement homogène pour l'inscription au catalogue des nouvelles variétés, impose aux Etablissements de sélection de nombreuses années de travail. L'obtention d'individus homozygotes est primordiale en Amélioration des plantes. Elle est réalisée, habituellement par l'application d'un système de reproduction fortement consanguin, en général, l'autofécondation. Dans le cas du Blé, l'application simultanée d'une pression de sélection et de la consanguinité, conduit après une dizaine de générations à quelques lignées fixées pour les caractères recherchés. Les récentes découvertes concernant la technique d'androgenèse in vitro, qui facilite l'obtention de plantes haploïdes, et permet d'obtenir un matériel parfaitement homozygote en une seule étape, laissent envisager de nouvelles perspectives pour la création de lignées homozygotes.

En 1953, TULECKE (1012) obtient les premières formations de tissus haploides, chez le Ginkgo, par culture in vitro de pollen.En 1964, en cultivant des anthères de Datura sur milieu gélosé, GUHA et MAHESWARI (354-355), produisent des embryons et des plantules haploïdes. Ces expériences furent développées en France chez le Tabac, en 1967, par BOURGIN et NITSCH (107). Depuis lors, de nombreux laboratoires ont réussi l'obtention de plantes haploides in vitro.

Chez les Graminées, plus de 10 genres fournissent actuellement des plantes d'origine pollinique. Citons le Riz (637), l'Orge (172) le Blé (167-714-743-1054) et le Mais (22). En ce qui concerne le Blé tendre - Triticum aestivum L.-, les premiers résultats ont été obtenus par des chercheurs chinois en 1971 -cité par OUYANG (714)-. Au Laboratoire d'Amélioration des plantes d'Orsay, les travaux débutés en 1971 ont abouti à la formation de plantes haploides en 1973 -PICARD et DE BUYSER (744)-.Cette même année, des Chinois publiaient leurs résultats -CHU et coll. (167), OUYANG et coll.(714), WANG et coll.(1054). Depuis cette période, seuls quelques autres laboratoires ont obtenus des plantes haploides de Blé par cette technique : au Canada CRAIG (199), aux Etats-Unis : HEYNE et coll. (410) - LIANG et coll. (534) - SCHAEFFER et coll. (838), au Japon :

SHIMADA (867), et en Suisse : SCHMIDT (844).

L'obtention des plantes haploïdes, ainsi que l'utilisation en sélection des haploïdes doublés, posent de nombreux problèmes pratiques et théoriques. Dans le cadre de la Faculté des sciences d'Orsay, les travaux d'androgenèse chez le Blé tendre ont été poursuivis dans deux direction. L'une plus théorique porte sur un schéma de comparaison de différentes techniques de sélection : GIS Moulon, l'autre plus appliquée a été réalisée en collaboration avec plusieurs Etablissements privés.

Le but de notre travail est de montrer que l'androgenèse par culture d'anthères in vitro peut être utilisée pour la création variétale. Nous avons donc choisi d'effectuer toutes nos recherches sur des origines génétiques effectivement utilisées par les sélectionneurs. Aussi, chaque année, depuis 1975, nous disposons de géniteurs qui ont été retenus en sélection classique. La culture d'anthères in vitro nous permet d'obtenir des plantes haploïdes doublées. Les semences sont fournies aux sélectionneurs, qui les placent en conditions naturelles, pour leur faire subir les tests habituels.

Une de nos premières démarches est de montrer que les descendances issues d'haploïdes doublés ne se comportent pas différemment des variétés classiques. Aussi, chaque année, nous avons cherché à produire un maximum de plantes haploïdes doublées, afin de les observer en comparaison avec les meilleures variétés françaises.

La seconde étape consiste à envisager, pour l'androgenèse, le passage d'une technique de laboratoire vers un outil utilisable pour la sélection du Blé. En effet, nos premiers travaux en culture d'anthère in vitro, portaient sur des variétés et concernaient des effectifs limités. Ils n'apportaient donc que des informations très ponctuelles sur le rendement de la technique.

Enfin, durant cette expérimentation, nous avons rencontré de nombreux problèmes, souvent inattendus, et nous nous sommes efforcés de répondre aux questions soulevées.

La thèse que nous avons rédigée reprend ces différents points que nous aborderons du point de vue suivant :

- En premier lieu, nous étudierons l'obtention des plantes haploïdes doublées. Comme chez la plupart des Graminées, elle comprend plusieurs phases : la première étant l'obtention d'embryons, la seconde leur régénération et éventuellement leur doublement par la colchicine. En androgenèse, le rendement qui peut être le nombre d'embryons ou de plantes haploïdes pour un épi, pour cent anthères ou encore pour cent microspores mises en culture, est l'un des problèmes déterminant pour l'utilisation de cette technique.
. l'analyse cytologique de l'évolution des microspores au cours de la culture in vitro nous a permis de préciser un certain nombre de points, ou de faire quelques hypothèses sur la formation des embryons d'origine pollinique.
. les expériences et les observations que nous avons effectuées, nous ont apporté des informations sur l'incidence de divers paramètres qui interviennent tant au niveau de la technique que du matériel ayant servi à la culture des anthères : génération de sélection, génotype, milieux de culture, effets épi, fleur et anthère, âge et qualité des embryons.
. la culture des microspores ne conduit pas nécessairement à des plantes haploïdes chlorophylliennes. D'une part nous observons la formation de plantes spontanément diploïdes dont nous avons recherché l'origine, d'autre part certaines plantes sont déficientes chlorophylliennes.

- En second lieu, nous étudierons le comportement des descendances d'haploïdes doublés spontanés ou après traitement. Pour être utilisables en sélection, les haploïdes doublés doivent répondre à plusieurs critères :
. l'homogénéité : les descendances d'un haploïde doublé doivent toutes présenter un comportement identique.
. la stabilité : au cours des générations successives de multiplication, les lignées haploïdes doublées doivent maintenir leurs caractéristiques.
. la variabilité : les HD doivent exprimer la variabilité contenue dans le matériel de départ, compte tenu de la génération de sélection.

. la valeur agronomique : les HD doivent posséder une valeur agronomique comparable à celle des lignées obtenues par sélection classique.
. le gain de temps : l'un des intérêts de l'androgenèse est la possibilité d'obtenir la fixité en un temps réduit.

Le comportement anormal de certains haploïdes doublés nous a conduit à effectuer une analyse des mitoses et des méioses, afin de déceler d'éventuelles anomalies chromosomiques.

Enfin, compte tenu des résultats obtenus, nous pourrons discuter de la génération de sélection optimale pour l'insertion de cette technique dans les schémas de sélection.

- L'étape ultime de ce travail sera l'inscription, au catalogue officiel des nouvelles variétés, de lignées provenant des haploïdes doublés que nous avons obtenu au laboratoire d'Amélioration des Plantes.

MATERIEL ET TECHNIQUES

I. MATERIEL VEGETAL : Les Blés tendres de type hiver ou alternatifs que nous avons utilisés-Triticum aestivum L., 2n = 6x = 42 -, nous ont été fournis par les Etablissements BENOIST, DESPREZ, MOMONT, R.A.G.T. et TOURNEUR. Ils proviennent de différents générations et schémas de sélection (Annexe 1).

Il est sans grand intérêt immédiat d'énumérer les généalogies de toutes les origines testées en culture d'anthères, dans la mesure ou la plupart des géniteurs sont des lignées non inscrites au catalogue des variétés françaises. Cependant, nous avons signalé quelques variétés, connues en sélection traditionnelle pour être à l'origine de nombreuses anomalies lorsqu'elles sont utilisées comme géniteurs (Annexe 2).

II. ORGANIGRAMME : Le plan général de notre travail est indiqué sur le Tableau 1. Les graines reçues courant septembre sont mises à germer chaque quinzaine, à raison de 15 plantes par origine. Après vernalisation, les plantes sont repiquées en serre éclairée pendant la période d'hiver et de printemps, où elles sont cultivées jusqu'au prélèvement des talles. Les anthères sont alors à un stade proche de la première mitose pollinique, ce qui correspond à un épi encore contenu dans la gaine. Les talles entières sont conservées à 3° C durant plusieurs jours, dans des flacons contenant de l'eau.

Le jour de la mise en culture, les épis sortis de la gaine sont désinfectés à l'hypochlorite de calcium (40g/l) puis rincés à l'eau stérile. Les anthères sont prélevées et déposées à la surface du milieu. Les boites sont entreposées dans une pièce de culture climatisée à 27°C ± 2°C. A partir de la quatrième semaine de culture, l'observation permet de repérer les embryons sortant des anthères. Ils seront transférés sur un milieu de régénération, et entreposés dans les mêmes conditions que les anthères. Les plantes régénérées sont ensuite placées en tube. Au cours du transfert, des pointes de racines sont prélevées et permettent de déterminer le niveau de ploïdie.

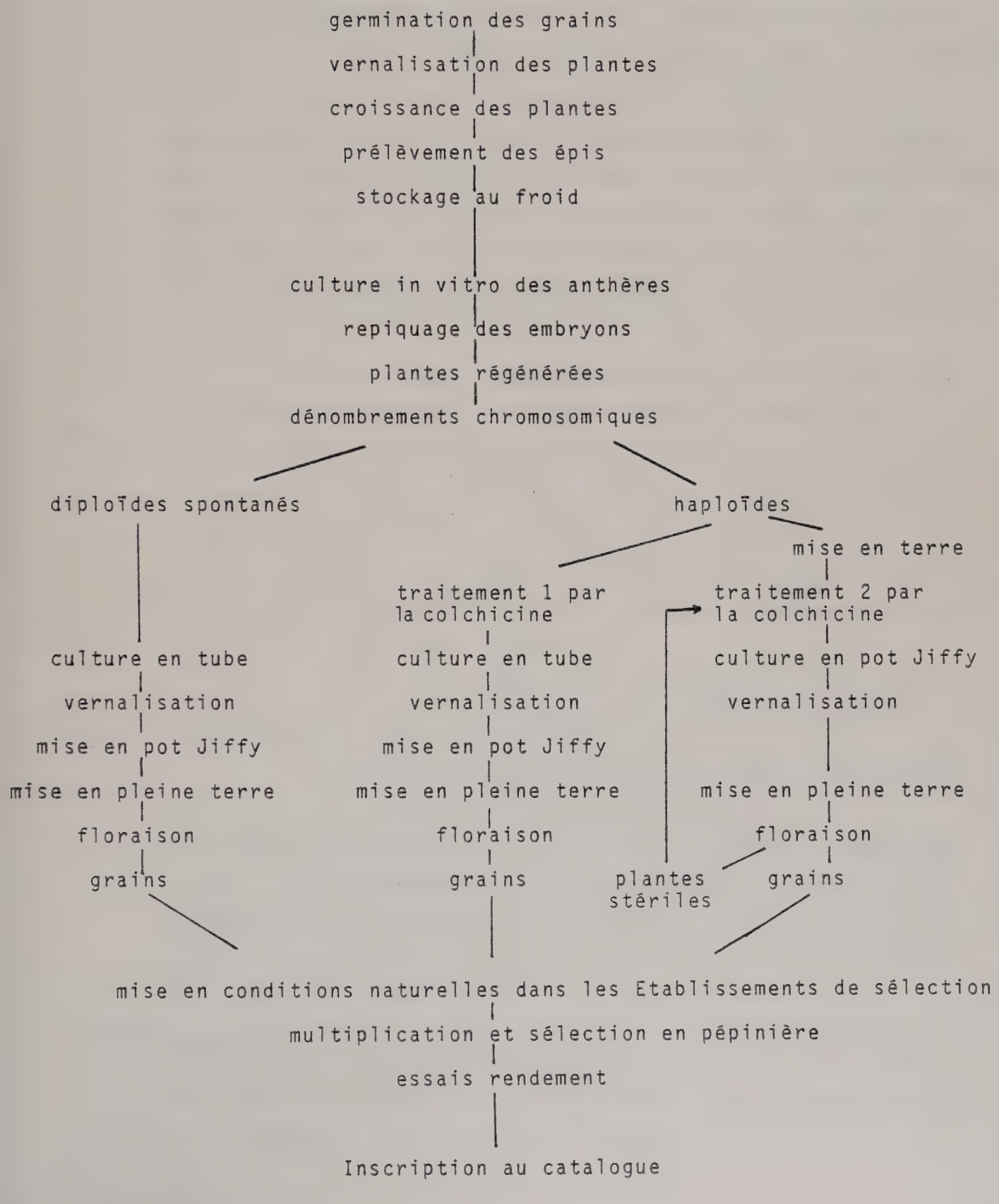
- Les diploïdes spontanés (2n = 42) sont vernalisés en tube, puis mis en terre après passage en pots "Jiffy". L'autofécondation

contrôlée permet d'obtenir les grains de ces plantes cultivées en serre.

- Les haploïdes (n = 21) sont traités à la colchicine, soit aseptiquement, soit après passage en terre. Après vernalisation, ils seront placés dans les mêmes conditions que les diploïdes spontanés.

Les semences récoltées sont fournies aux sélectionneurs, pour être placées dans les conditions de sélection habituelles (pépinières, essais).

TABLEAU 1 : Schéma général des différentes étapes.



III. TECHNIQUES :

1) Technique de culture in vitro

a) Milieux de culture des anthères : Plus de quarante milieux ont été testés. Les principaux sont indiqués dans les Annexes 3 et 4. Ces milieux se caractérisent par une forte concentration en saccharose (80 à 120 g/l), la présence de 2-4 D (1,5 ou 2 mg/l) et de fer EDTA 10^{-4}M. Les variations importantes portent sur les macro et micro-éléments, les vitamines et les acides aminés. Plusieurs types de milieux ont été testés, liquides ou solides, ces derniers pouvant être entièrement synthétiques ou complémentés avec de l'extrait de pomme de terre. Celui-ci est réalisé conformément à la publication Chinoise du 301 RESEARCH GROUP (27) avec la variété Bintje.

En 1979, nous avons expérimenté 5 milieux gélosés contenant de l'extrait de pomme de terre:CHUANG et coll. (171), obtenu à partir du même stock de tubercules récoltés mi-septembre 1978. Le premier extrait a été réalisé juste après la récolte (P_1), le second (P_2) après trois mois de conservation, le troisième (P_3) après 5 mois de conservation et les derniers après 7 mois, à partir de tubercules épluchés (P_{4A}) ou non épluchés (P_{4B}). Ces extraits ont été utilisés soit frais, soit après congélation.

En 1980, les comparaisons portent sur un extrait réalisé après 5 mois de stockage des tubercules, et sur les extraits 1 et 3 de l'année précédente.

Le pH est ajusté à 5,8-5,9 par NaOH N, et tous les milieux sont autoclavés 20 minutes à 115°C.

b) Milieux de régénération : Deux milieux de base ont été utilisés : R_8(synthétique) et RP (contenant de l'extrait de pomme de terre) (Annexe 5). Diverses modifications du milieu RP ont été testées : apport de glutamine, d'AIA, de zéatine ou d'agarose, absence de gélifiant.

2) Repiquage en terre : lorsque les plantes mesurent une dizaine de centimètres et possèdent un enracinement suffisant, elles peuvent être repiquées en terre dans des pots contenant du terreau. Les pertes à ce niveau sont réduites.

3) Techniques cytologiques :

a) Observation des microspores : Pour les microspores et les proembryons multicellulaires, la coloration au carmin acétique est suffisante. La coloration du noyau, et la présence d'un cytoplasme caractérisent les microspores et les proembryons vivants.

b) Dénombrements chromosomiques : Un prétraitement par 1'α-bromonaphtalène (1%) est nécessaire pour les dénombrements sur pointes de racines, durant 16 heures, à 5°C. La fixation est réalisée dans l'acide acétique à 90% durant 30 minutes. La coloration est effectuée selon la technique de Feulgen, ou par le carmin chlorhydrique.

4) Techniques de traitement par la colchicine : Le matériel haploïde (n = 21) est soumis au traitement à la colchicine (HENRY et DE BUYSER 1980 (395), en vue d'obtenir le doublement du stock chromosomique. Deux techniques sont utilisées :

- Traitement n° 1 : Quand les plantes en tube possèdent plusieurs talles, le traitement se déroule en conditions aseptiques -sous une enceinte à flux laminaire-. Les plantes sont éclatées en talles individuelles. Une talle conservée comme témoin est immédiatement repiquée sur le milieu de régénération R_8 (PICARD et DE BUYSER 1973 (743). Les autres talles sont trempées durant trois heures dans une solution stérile à 0,2 % de colchicine et 2 % de diméthylsulfoxide (DMSO). Ces talles, rincées deux heures dans l'eau stérile, sont séchées et replacées sur le milieu R_8, à raison d'une talle par tube. Cette technique est voisine de celle utilisée pour l'Orge (JENSEN 1974 (468).
- Traitement n° 2 : Celui-ci concerne les plantes haploïdes cultivées en serre sans vernalisation. Lorsque le tallage est suffisant, les plantes sont éclatées en talles individuelles et trempées durant quatre heures trente dans une solution à 0,25 % de colchicine et 2 % de DMSO. Après le traitement qui a lieu dans les conditions de la serre, les plantes sont rincées à l'eau courante, puis chaque talle traitée est repiquée en pot Jiffy.

5) Technique d'électrophorèse des gliadines : Les électrophorèses des gliadines en gel d'amidon ont été effectuées au Laboratoire d'Analyses de l'I.T.C.F. par Madame LEBRUN, selon la technique d'AUTRAN et BOURDET 1975 (55). Cette technique permet d'obtenir de nombreuses bandes. De nombreux gènes interviennent dans leur déterminisme -WRIGLEY et SHEPHERD 1973 (1105), MECHAM et KASARDA 1978 (575).

6) Travaux de sélection : Lorsque le matériel obtenu par culture d'anthères a produit des semences, celles-ci sont fournies aux Etablissements sélectionneurs, pour être placées en multiplication dans leurs pépinières de sélection, en conditions naturelles de champ, et y subir un ou deux cycles de sélection classique. Les lignées retenues sont alors disposées dans des essais, en comparaison avec des témoins, afin de juger leur rendement et leur comportement dans les conditions de culture.

Les dispositifs expérimentaux sont, soit des essais bloc à 4 répétitions, soit des lattices 25 à 4 répétitions, dont les surfaces élémentaires sont de 6,5 m^2. Les témoins utilisés sont parmi les meilleures variétés françaises actuellement cultivées. Lorsque cela était possible, il a été procédé à des essais multilocaux, dans des zones différentes : Zone I (Nord de la France), Zone II (Bassin Parisien), Zone III (Aveyron), Zone IV (Sud de la France).

RESULTATS

L'androgenèse chez le Blé tendre se caractérise par deux périodes : l'obtention des embryons et la régénération des plantes, qui nécessitent des conditions de culture différentes. Depuis 1976, près de 3 millions d'anthères ont été mises en culture, et ont permis d'obtenir 38033 embryons et 2026 plantes chlorophylliennes d'origine pollinique. Les Annexes 7 à 12 indiquent les résultats par génotype et par année. Au cours de ce travail, nous avons pu accroître sensiblement le rendement en embryons (x3), ainsi que le nombre de plantes vertes obtenues pour 1000 anthères cultivées (x4).

Tableau 2 : Bilan général : Evolution des résultats.

Année	1976	1977	1978	1979
Nombre d'anthères cultivées (1)	297.162	315.353	406.407	391.801
Nombre d'embryons obtenus (2)	2.330	2.342	2.162	4.253
2/1 (%)	0,8	0,8	0,5	1,1
Nombre de plantes vertes régénérées (3)	91	286	105	315
Taux de régénération 3/2 (%)	3,9	12,2	4,9	7,4
Nombre de plantes vertes pour 10.000 anthères	3,0	9,0	2,5	8,0
Nombre de plantes vertes placées en première multiplication (4)	43	121	58	215
4/3 (%)	47	42	55	68

Année	1980	1981	1982
Nombre d'anthères cultivées (1)	469.360	332.700	271.960
Nombre d'embryons obtenus (2)	13.599	6.064	7.303
2/1 (%)	2,9	1,8	2,6
Nombre de plantes vertes régénérées (3)	540	328	361
Taux de régénération 3/2 (%)	4,0	5,4	5,0
Nombre de plantes vertes pour 10.000 anthères	11,5	9,8	13,0
Nombre de plantes vertes placées en première multiplication (4)	299	196	-
4/3 (%)	55	60	-

L'amélioration des rendements en embryons peut être reliée à un accroissement de l'efficacité des techniques -meilleure organisation, milieux plus performants,..-. Par contre, le taux de régénération n'a guère progressé. Actuellement, le rendement moyen obtenu est de une plante verte pour 1000 anthères. Cependant, pratiquement tous les génotypes ont fourni au moins une plante chlorophyllienne, et la meilleure origine se situe à 4 plantes chlorophylliennes pour 100 anthères. Tous ces points seront précisés lors de l'étude détaillée de l'obtention des embryons et de la régénération des plantes. Il ne semble plus exister, actuellement, de génotypes inaptes à l'androgenèse.

Les données concernant 65 haploïdes doublés nous ont permis de déterminer la durée moyenne de chacune des phases du cycle de ce travail (HENRY et DE BUYSER 1980 (395), de la germination des semences à l'obtention des graines sur les haploïdes doublés. Le Tableau 3 montre que les cycles entiers sont d'environ 18 mois dans le cas des haploïdes, et de 16 mois dans celui des diploïdes spontanés. Ceci explique que, dans notre schéma de travail, les semences soient retournées aux établissements de sélection près de 2 ans après la fourniture du matériel sur lequel nous travaillons. Si dans le meilleur des cas, la durée du cycle peut être réduite à un an, ceci n'est pas envisageable dans un travail de routine où les mises en culture doivent s'échelonner sur une période de 6 mois.

Les premières plantes haploïdes doublées obtenues ont été observées en pépinières et soumises à la sélection. Actuellement, 100 lignées haploïdes doublées ont pu être placées en essai rendement, et deux lignées HD ont été présentées à l'inscription. Ces aspects seront développés dans le chapitre concernant l'utilisation des HD.

Tableau 3 : Durée moyenne des différentes étapes (en semaines) :

Etapes	Durées (en semaines) Haploïdes (n=3x=21	Diploïdes (2n=6x=42
germination - mise en serre	9	
mise en serre - prélèvement	8	
conservation au froid	1	
obtention des embryons	4,5	4,5
culture en tube	14,5	8
vernalisation	8	
sortie de vernalisation - floraison	21	19
floraison - récolte	12	15
Total	78	72,5

I. OBTENTION DES EMBRYONS : L'androgenèse in vitro a pour objet de faire développer les microspores. Les anthères, prélevées lorsque le noyau des microspores est en phase G_2 du cycle cellulaire précédant la première mitose, doivent être placées sur un milieu approprié. Après une phase de latence, les divisions débutent. Les proembryons âgés d'une dizaine de jours contiennent une quinzaine de cellules. Seules quelques unes de ces structures aboutissent à un embryon visible après quatre semaines de culture.

Nous avons vu que le rendement de la technique se situe en moyenne au niveau de 2 embryons pour cent anthères mises en culture. Si chaque anthère possède environ 2000 grains de pollen, la fréquence d'embryons obtenus est donc d'un pour cent mille microspores cultivées in vitro. Ce résultat tendrait à montrer que l'androgenèse est un évènement rare. Cependant pour les meilleurs génotypes nous observons jusqu'à 20 embryons pour 100 anthères, soit une fréquence d'1 embryon pour 10^4 microspores. Ce résultat est du même ordre de grandeur que ceux obtenus chez le Tabac qui est actuellement l'espèce la plus apte à l'androgenèse.

Bien qu'étant encore faible, la fréquence d'embryons peut s'élever jusqu'à 2 pour cent microspores dans la meilleure anthère que nous ayions observée. L'androgenèse in vitro ne concerne donc qu'un très faible échantillonnage de la population gamétique mise en culture in vitro. Il faut donc avoir présent à l'esprit, au

cours de l'étude qui va suivre qu'il s'agit d'un phénomène rare. Cependant l'utilisation pratique de cette technique dans des programmes de sélection ne nécessite pas nécessairement des rendements très élevés. Ainsi, s'il était possible d'obtenir régulièrement 1 embryon pour 1000 microspores, soit 2 par anthère -comme c'est le cas actuellement dans les meilleurs épis- (Tableau 4), cela équivaudrait à plus de 200000 embryons obtenus par an par une personne travaillant à temps plein. Les potentialités de l'androgenèse sont donc très élevées.

Au cours de l'étude qui suit, nous décrirons l'évolution des microspores cultivées in vitro en comparant, par une analyse cytologique, deux génotypes très différents. Puis nous envisagerons les paramètres qu'il est possible de modifier pour améliorer le rendement, ou qui sont susceptibles d'intervenir. Une grande partie du travail a donc consisté à mettre au point des milieux de plus en plus performants. Ces expériences nous ont permis de tester l'influence des génotypes et de la génération de sélection. Nous avons pu également constater le rôle joué par certains facteurs physiologiques concernant la plante et l'épi.

A. Analyse cytologique des microspores durant la culture in vitro :

Parmi les génotypes utilisés au cours de l'année 1982, la F_4 618 (A) et la F_8 B_1 (B) ont fourni des résultats très différents (Annexe 12). Avec le génotype A, nous avons obtenu en moyenne 1 embryon pour 5 épis cultivés, contre plus de 5 embryons par épi chez B. Les résultats diffèrent également très largement en ce qui concerne le nombre maximum d'anthères embryogènes par épi (5 chez A et plus de 20 chezB), et le nombre maximum d'embryons par anthère embryogène (3 chez A et plus de 20 chez B). Possédant une bonne indication de la valeur de ces génotypes en cours d'année, nous les avons utilisés pour une expérience d'analyse cytologique de l'évolution des microspores durant la culture.

Les données bibliographiques et des observations préliminaires indiquant une phase de latence d'environ une semaine, avant le démarrage de l'embryogenèse, nous avons choisi de débuter l'analyse à partir de 7 jours après la mise en culture. 6 anthères ont donc été prélevées au hasard parmi les anthères de chaque épi, après 7, 9, 11, 13 et 17 jours de culture. L'observation porte, après dissec-

tion de l'anthère dans le carmin acétique, sur 200 microspores par anthère, sauf lors de la mise en culture et après 7 jours de culture, où nous n'avons observé que 200 microspores provenant du mélange de 3 anthères. Nous disposions de 16 épis du génotype A et de 24 épis du génotype B, avec en moyenne 73,7 anthères par épi pour A et 80 pour B.

Lors de la mise en culture, 3 anthères sont prélevées dans la zone la plus âgée de l'épi. L'observation des microspores montre que tout le matériel mis en culture est uninucléé. Le pourcentage de microspores mortes est très faible, et voisin de 1 %. Il n'existe pas de différence entre les deux génotypes.

Durant cette expérience, nous n'avons pas observé l'apparition d'embryons sur les anthères (non prélevées) du génotype A. Par contre, dans le cas du génotype B, la moitié des épis possédaient au moins une anthère embryogène.

Tableau 4 : Rendement, en nombre d'embryons repiqués, observé pour 100 anthères et 100 microspores, pour l'ensemble des génotypes, le meilleur génotype, le meilleur épi et la meilleure anthère.

	Rendement observé pour	
	100 anthères	100 microspores
ensemble des génotypes	2	0,001
meilleur génotype	20	0,01
meilleur épi	200	0,1
meilleure anthère	4000	2,1

a) Taux de survie des microspores : Après 7 jours de culture, pratiquement toutes les anthères possèdent encore des microspores vivantes (Tableau 5). La mortalité croît fortement entre 7 et 9 jours. Une différence entre les deux origines se manifeste à ce niveau : près des trois quarts des anthères de l'origine A ne contiennent plus de microspores vivantes (noyaux colorables) après 9 jours de culture, contre la moitié seulement pour B. Cette fréquence diminue progressivement, et devient très faible après 17 jours de culture. Néanmoins, l'origine B possède davantage d'anthères contenant des microspores vivantes (18 % contre 2 % à A).

Les génotypes A et B se différencient donc au niveau de la fréquence des anthères contenant des microspores vivantes.

Lors de la mise en culture, les deux origines sont identiques, puisqu'elles ne possèdent que 1 % de microspores mortes. Mais après 7 jours de culture, la grande majorité des microspores sont mortes. Ainsi, le pourcentage de pollen vivant n'est plus que de 10 % pour A, alors qu'il est encore près du triple pour B (26 %). Ce taux de survie pollinique décroît très fortement entre 7 et 9 jours. A 17 jours, les anthères du génotype A ne contiennent pratiquement plus de microspores vivantes (moins de 0,05 %), contrairement à B où le taux de survie est de 0,7 %.

Là encore, les deux origines, A et B se différencient par un taux de survie pollinique différent, notamment après 17 jours de culture.

Tableau 5 : Evolution des microspores durant la culture in vitro.

Age des cultures (jours)	Génotype	Pourcentage d'anthères contenant des microspores vivantes	Taux de survie des microspores	Nombre moyen de noyaux par microspore survivante	Nombre maximum de noyaux
0	A	100	98,94	1,-	1
	B	100	98,98	1,-	1
7	A	94,5	10,69	1,7	7
	B	100	26,26	1,5	12
9	A	26,-	1,79	2,4	12
	B	45,5	4,71	2,-	20
11	A	15,8	2,24	4,-	20
	B	42,4	2,63	4,-	25
13	A	17,-	1,40	8,8	32
	B	31,6	1,97	6,5	55
17	A	2,1	0,046	20,1	80
	B	17,6	0,70	9,1	100

b) Evolution des microspores in vitro : Pour pratiquement toutes les dates où des anthères ont été prélevées, le nombre moyen de noyaux par microspore est plus élevé pour le génotype A que pour le génotype B. Il semble donc que chez ce génotype, les divisions démarrent plus tôt. Les différences observées entre les génotypes A et B, peuvent s'expliquer par les taux de survie pollinique différents. Ainsi, pour l'origine A, il ne reste que des pollens plurinucléés (plus de 6 noyaux) après 17 jours de culture, alors que l'origine B possède encore de nombreuses microspores uninucléées, binucléées, ou avec de 3 à 5 noyaux.

Cependant, si l'on s'intéresse au nombre maximum de noyaux par grain de pollen, les embryons les plus évolués ont été observés pour l'origine B, à toutes les dates.

Le choix des épis est excellent puisque tous les épis possèdent des microspores uninucléées au moment de la mise en culture. Mais cette observation indique que le stade des microspores est insuffisant, à lui seul, pour choisir les épis efficaces, dans la mesure où seulement près d'un quart des épis se sont révélés embryogènes.

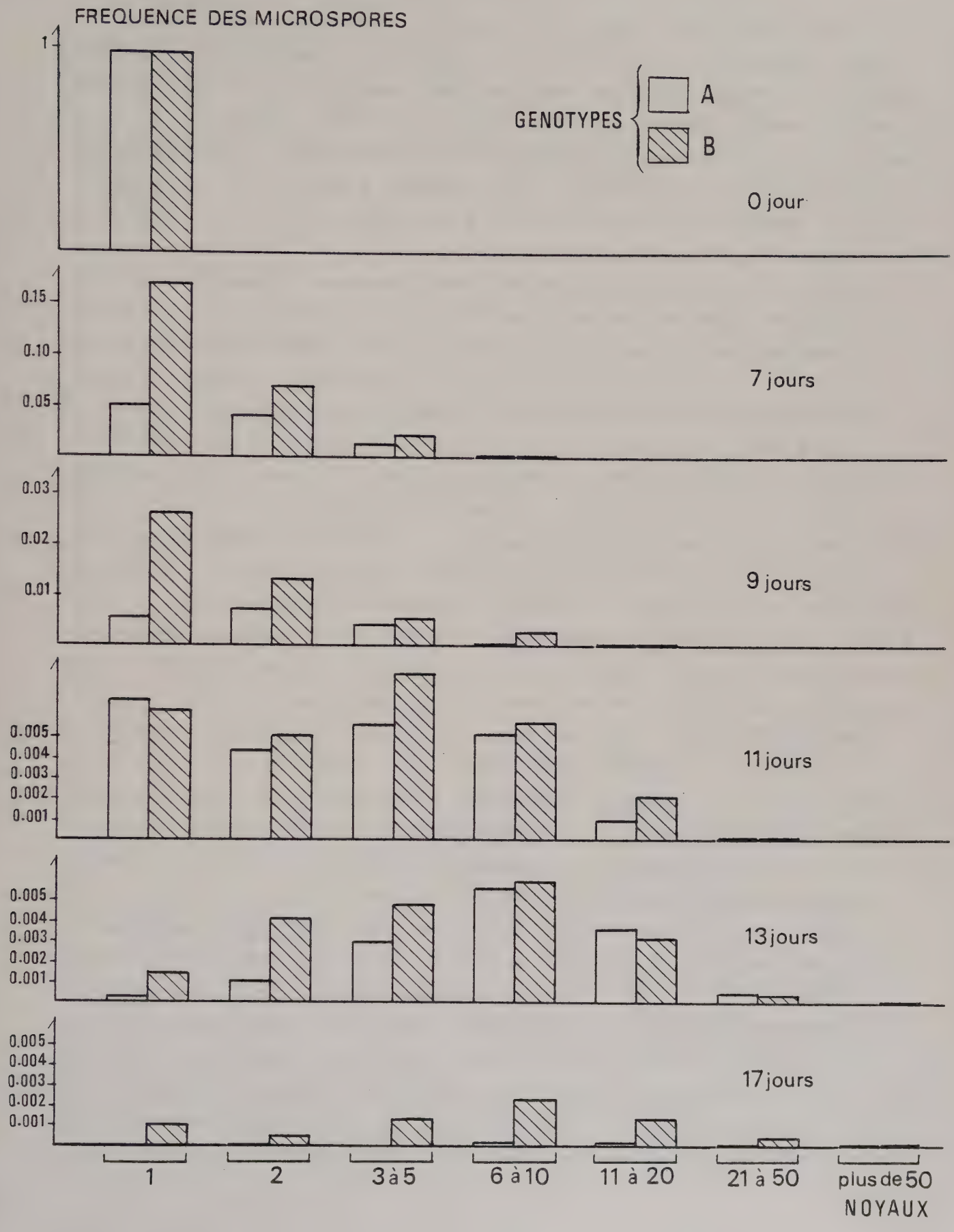
L'observation cytologique des microspores après 7 jours de culture (Tableau 6 et Figure 1) montre qu'une grande partie des microspores sont uninucléées ou binucléées. Il est logique de penser que, comme chez le Tabac (PELLETIER (738), il existe une phase de latence avant le début du développement embryonnaire. A cette date, les deux origines ne semblent pas différer, cependant B possède le grain de pollen multicellulaire le plus avancé (12 noyaux).

Tableau 6 : Evolution des microspores en culture.

âge des cultures (jours)	génotype	données	effectif total observé	état d'évolution des microspores (nombre de noyaux) mortes		2	3 à 5	6 à 10	11 à 20	21 à 50	plus de 50
0	A	°E	3100	33	3067						
		%	100	1,06	98,94						
	B	E	4500	46	4454						
		%	100	1,02	98,98						
7	A	E	6400	5716	321	274	87	2			
		%	100	89,31	5,02	4,28	1,36	0,03			
	B	E	9500	7006	1630	636	224	4			
		%	100	73,75	17,16	6,69	2,36	0,04			
9	A	E	19200	18855	110	136	82	13	4		
		%	100	98,20	0,57	0,71	0,43	0,07	0,02		
	B	E	26400	25158	690	338	138	65	11		
		%	100	95,29	2,61	1,28	0,52	0,25	0,04		
11	A	E	18800	18378	121	83	104	97	15	2	
		%	100	97,75	0,67	0,44	0,55	0,51	0,08	0,01	
	B	E	25000	24343	152	125	187	138	53	2	
		%	100	97,37	0,61	0,50	0,75	0,55	0,21	0,01	
13	A	E	18800	18537	6	21	55	104	69	8	
		%	100	98,60	0,03	0,11	0,29	0,55	0,37	0,04	
	B	E	27200	26664	47	109	130	158	83	8	1
		%	100	98,03	0,17	0,40	0,48	0,58	0,31	0,03	0,004
17	A	E	19200	19191	-	1	-	3	3	1	1
		%	100	99,953	-	0,005	-	0,016	0,016	0,005	0,005
	B	E	26200	26015	30	13	35	61	33	11	2
		%	100	99,29	0,11	0,05	0,13	0,23	0,13	0,04	0,01

° E : effectif

Figure 1 : Evolution des microspores en culture



Deux jours plus tard, l'évolution s'est poursuivie, et le nombre de microspores possédant plus de 5 noyaux augmente. Les nombres maximum de noyaux observés sont respectivement de 12 pour A et de 20 pour B. Après 11 jours de culture, nous observons une remontée de la fréquence des microspores possédant de 3 à 5 noyaux (Figure 2). Ceci semble indiquer qu'il existe une seconde phase d'induction des divisions entre 9 et 11 jours de culture, qui pourrait être à l'origine des microspores à plus de 10 noyaux dont la fréquence augmente très fortement entre 11 et 13 jours de culture. A 11 jours, la différence entre les deux origines porte essentiellement sur la fréquence des anthères contenant des microspores vivantes.

Les analyses cytologiques effectuées deux jours plus tard indiquent que la dégénérescence des microspores plurinucléées a débuté. Ainsi donc, il existe une phase critique entre 11 et 13 jours de culture. Cette étape pourrait correspondre à la rupture de l'exine des microspores plurinucléées. La comparaison des deux origines A et B ne révèle rien de significatif. Ainsi, par exemple, il existe 19,3 microspores à plus de 5 noyaux pour la moyenne des anthères pour l'origine A et 18,4 pour B. Ceci indique que le taux d'induction est identique dans les deux origines. Nous avons observé quelques anthères exceptionnelles dans les deux origines (Tableau 7), comme il en existe chez le Tabac (PELLETIER (738). Dans plusieurs d'entre elles, nous avons dénombré plus de 170 embryons pour 700 microspores observées (Figure 3). Ces effectifs remarquablement élevés, correspondent à un démarrage de l'embryogenèse dans un quart des microspores de l'anthère.

A partir de 13 jours, la dégénérescence des jeunes embryons s'accentue (Figure 2), et seule une fraction poursuivent leur développement embryonnaire. Pour le génotype A, le taux de survie devient très faible à 17 jours de culture, et les différences avec le génotype B deviennent manifestes. Ce dernier possède davantage d'embryons bien structurés. L'observation la plus importante que nous ayions réalisée à cette date, concerne le fort taux de dégénérescence : peu de microspores plurinucléées à 13 jours poursuivent leur évolution et parviennent à former de véritables embryons.

Figure 2 : Evolution des microspores plurinucléées.

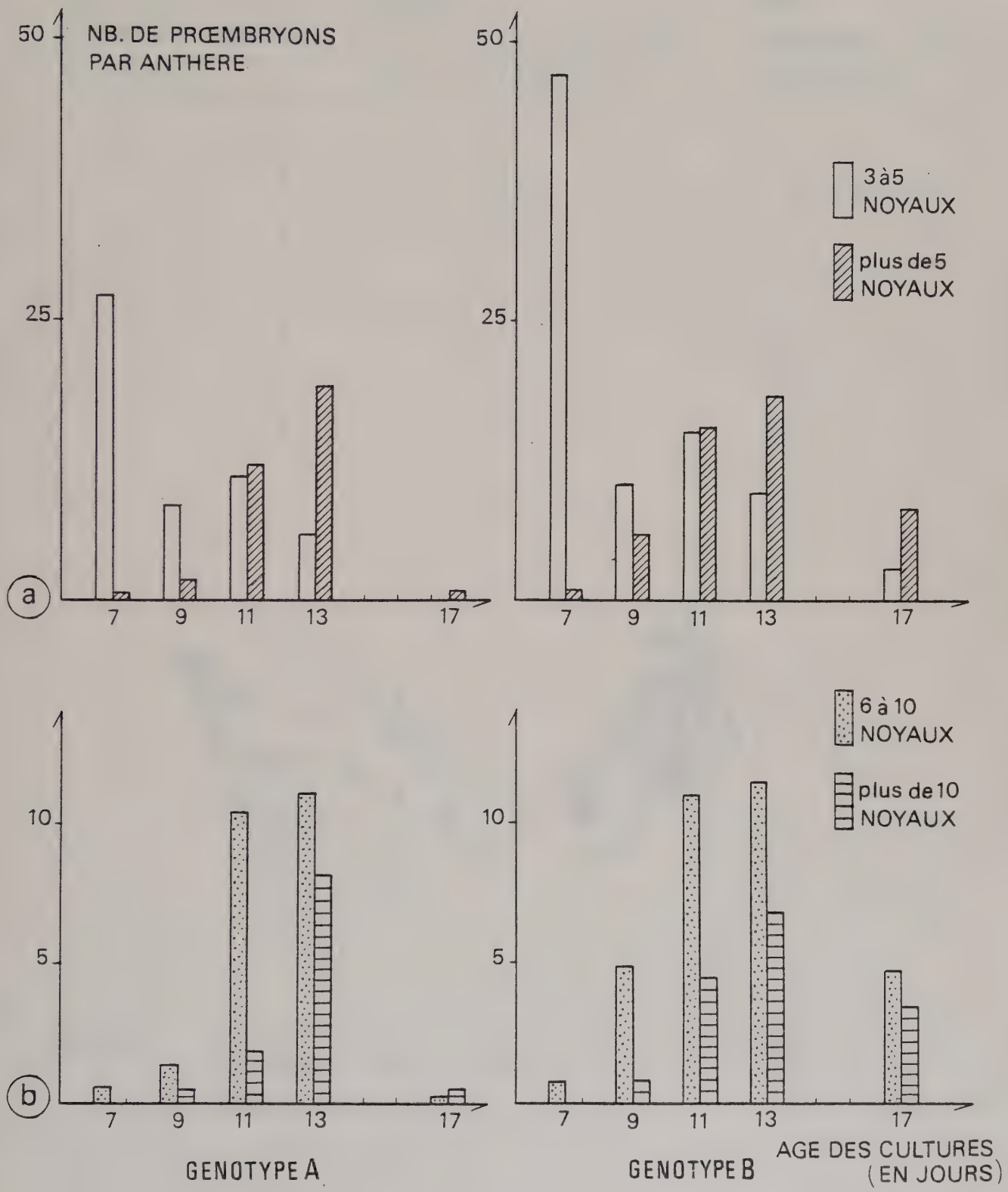


Tableau 7 : Anthères exceptionnelles.

Durée de culture en jours	Génotype	Nombre de microspores observées sur la préparation (1)	Nombre d'embryons observés(2)	2/1 %
9	A	1316	106	8,0
	B	983	98	9,9
13	A	696	177	25,3
	A	-	160	-
	B	-	107	-
	B	-	180	-
	B	-	171	-

Figure 3 : Fragments d'une anthère embryogène de Blé tendre contenant trente microspores multicellulaires ou jeunes embryons.

L'analyse cytologique de l'évolution des microspores durant la culture in vitro s'est révélée très intéressante. Plusieurs points ont retenu notre attention :

- le premier concerne la forte mortalité pollinique au cours de la première semaine de culture. Chez le Tabac, PELLETIER (738) observe davantage de microspores vivantes après 7 jours de culture (70 %).
- le second point porte sur l'induction des divisions embryonnaires. Chez le Blé, comme chez d'autres espèces, il existe une phase de latence d'une semaine environ dans nos conditions expérimentales. Nos résultats indiquent, comme dans le cas du Tabac (ARUGA et coll 1982 (1157)que les divisions précoces ne sont pas à l'origine des embryons obtenus par cultures d'anthères, mais pourraient aboutir à des formes plurinucléées qui dégénèrent rapidement. Nous remarquons également que les taux d'induction peuvent être très élevés dans certaines anthères. Ainsi, nous pouvons penser que chez le Blé, l'induction de l'androgenèse n'est pas le facteur limitant puisque sa fréquence est élevée (1,5 %des microspores) dans les deux origines. Cette donnée indique que les effets "génotype" observés en culture d'anthère de Blé n'ont pas leur origine au niveau de l'induction du phénomène. Il s'agira essentiellement d'augmenter le taux de survie des microspores plurinucléées, pour les amener à des stades embryonnaires plus avancés, tout en leur conservant une bonne structure.
- le troisième point se rattache aux différences entre les origines A et B. Elles portent essentiellement sur des taux de dégénérescence différents à partir de 13 jours de culture (Tableau 8). Il s'agit là d'une observation fondamentale qui implique que les recherches doivent porter sur la phase de culture in vitro qui se déroule entre 7 et 13 jours, pour assurer le développement des embryons induits. La cause de la dégénérescence plus fréquente des embryons d'origine A que de ceux d'origine B devrait être recherchée. Si cette dégénérescence est liée aux tissus diploïdes de l'anthère, ceci pourrait expliquer le déterminisme sporophytique du taux d'embryons (RAQUIN 1982 (787). Une remarque générale peut être formulée: les effets génotypiques observés en culture d'anthères de Blé notamment, peuvent être reliés directement à des avortements différents selon les origines, et non pas aux taux d'induction du phénomène qui dépasse en moyenne 25 micro-

spores par anthère dans les deux origines testées. Les interactions entre cellules jouent donc un rôle important. Cette analyse cytologique montre également les potentialités énormes de cette technique : pour génotype B, nous observons en moyenne, à 17 jours de culture, plus de 3 embryons possédant plus de 10 noyaux par anthère. Si nous extrapolons à un épi moyen mis en culture, ce résultat correspondrait à environ 250 embryons.

Tableau 8 : Pourcentage de microspores multicellulaires qui avortent, en fonction du génotype et du degré d'évolution.

Période d'avortement	Génotype	Nombre de noyaux			
		Plus de 5	Plus de 10	Plus de 20	Plus de 50
entre 13 et 17 jours	A	96,4 %	94 %	77,8 %	-
	B	56 %	49 %	0	-
entre 17 jours et la sortie des embryons de l'anthère	A	-	-	100 %	100 %
	B	-	-	97,5 %	83,1 %

En réalité, dans les anthères témoins, nous n'avons obtenu en moyenne après 4 à 6 semaines de culture, qu'un seul embryon par épi, et 12 embryons pour le meilleur épi. Un certain nombre d'observations nous ont permi de noter l'existence d'anomalies chromosomiques durant les mitoses (ponts anaphasiques, etc...) : elles pourraient être la cause d'une partie des avortements. Enfin, nous pouvons penser qu'il existe dans le milieu de culture, ce que nous appellerons un "facteur limitant". Il pourrait s'agir soit de la carence soit de la toxicité de métabolites. Seuls, les embryons parvenus à un stade avancé seraient capables de survivre dans ces conditions.

Un autre point fréquemment débattu, mais que nous n'avons pas analysé avec précision concerne le type de noyau qui participe à la formation des embryons polliniques. Pour notre part, nous n'avons pas observé de noyaux végétatifs et reproducteurs dans un embryon pluricellulaire : tout au plus existe-t-il durant la première phase de culture, des noyaux plus ou moins

intensément colorables (PAN et GAO 1980 (721) - ZANG et OUYANG 1980 (1129). Pour leur part, les noyaux des jeunes embryons possèdent une coloration uniforme (carmin acétique).

Les embryons semblent provenir pour l'essentiel de la cellule végétative (PEARSON and NILAN 1975 (729) - CHU C.C. et coll 1976 (169) - SUNDERLAND et coll 1977 (948) - MISOO et coll 1979 (596), comme dansle cas du Tabac où la cellule végétative des microspores binucléées est à l'origine des embryons (PELLETIER (738) - MII 1973 (586).

La mise en culture des anthères modifie les "informations" reçues par la microspore. Celle-ci est alors rendue apte à débuter les cycles mitotiques qui aboutissent à la formation des embryons. Cependant, la première division androgénétique n'apparaît qu'après une phase de latence d'environ une semaine chez le Tabac (PELLETIER (738) ou le Blé (HESKY MESCH 1976 (407) - PAN et GAO 1980 (721). Durant cette phase de culture, les microspores subissent de larges transformations, notamment aux niveaux des synthèses protéiques et de l'ADN (BHOJWANI et coll 1972 et 1973 (95-97). C'est également durant cette phase de latence que se produisent les endoreduplications qui sont à l'origine des embryons diploïdes spontanés (RAQUIN et coll 1982 (788).

B. Effets des milieux de culture des anthères :

En ce qui concerne la culture des anthères, nous avons testé de nombreux milieux (Tableau 9). La méthodologie utilisée est la suivante : les informations bibliographiques et notre propre expérience nous amènent à comparer chaque année quelques milieux types, les meilleurs servant de milieux témoins l'année suivante. Dans une première phase, nous avons retenu ceux à base d'extrait de pomme de terre. Dans une seconde étape, nous avons recherché, par une analyse systématique, à optimiser ces milieux.
- Milieux à base d'extrait de pomme de terre : Dès 1978, nous avons confirmé l'effet positif de cet extrait (ANONYMES 1976 (27) - HU et coll 1978 (430), lorsqu'il est ajouté au milieu de culture : notre rendement en embryons a été multiplié par trois (Tableau 9a).

Puis nous avons précisé la période de l'année à laquelle doit être réalisé cet extrait. Lorsque les tubercules de la

variété Bintje sont récoltés à maturité et stockés à 4-8°C, l'optimum se situe après 5 mois de stockage des tubercules (Tableau 9b). La supériorité du milieu P_4A sur P_CB montre que l'extrait doit être réalisé à partir de tubercules épluchés. La concentration en extrait de pomme de terre ne doit pas en outre être trop élevée, puisque le milieu B_4, réalisé à partir du même extrait que P, lui est inférieur.

Nous avons également montré qu'il est possible de conserver cet extrait de pomme de terre par congélation à -20°C, et que les extraits réalisés chaque année ne sont pas équivalents (Tableau 9c). L'extrait réalisé en 1979 et conservé 1 an est supérieur à l'extrait de 1980 (P_1 P). La qualité de l'extrait dépend donc de la qualité des tubercules au moment de la récolte.

- Milieux avec apport de glutamine : Dès 1978 le rôle positif de l'apport de glutamine a été mis en évidence (Tableau 9a). Ainsi, en milieu liquide, l'extrait de pomme de terre peut être remplacé par une concentration de 500 mg/l de glutamine (Figure 4). Celle-ci ne devient toxique qu'à partir de 1 g/l. Cette dernière concentration peut cependant être utilisée sans risque en milieu solide.

- Milieux divers : Nous avons montré que l'absence d'ions NO_3^- et l'apport de glutamine dans un milieu à base d'extrait de pomme de terre -milieu PM- ne semblent pas affecter le rendement en embryons (Tableau 9c). Une forte concentration en glutamine (1 g/l) et le remplacement de l'agar par de l'agarose permettent, en l'absence d'extrait de pomme de terre, d'obtenir une amélioration de l'efficacité en androgenèse, puisque dans ces conditions, trois épis sur quatre sont embryogènes.

A concentration égale, les milieux liquides semblent moins efficaces que les milieux solides (Figure 4), et présentent quelques désavantages (manipulation plus délicate, et risques d'infections plus élevés).

Cette étude sur les milieux de culture montre qu'il est possible de modifier le rendement en androgenèse. Cependant le milieu de culture influe non seulement sur le taux d'embryon obtenu, mais également sur leur qualité, c'est-à-dire sur leur aptitude à régénérer. Ainsi, les milieux les plus efficaces (Figure 5)

Tableau 9 : Efficacités comparées de différents milieux de culture.

a) 1978 :

Milieux	B	B_G	B_4
NA	209 862	29 988	129 424
NE	669	279	1 153
%	0,32 a	0,93 b	0,89 b

b) 1979 :

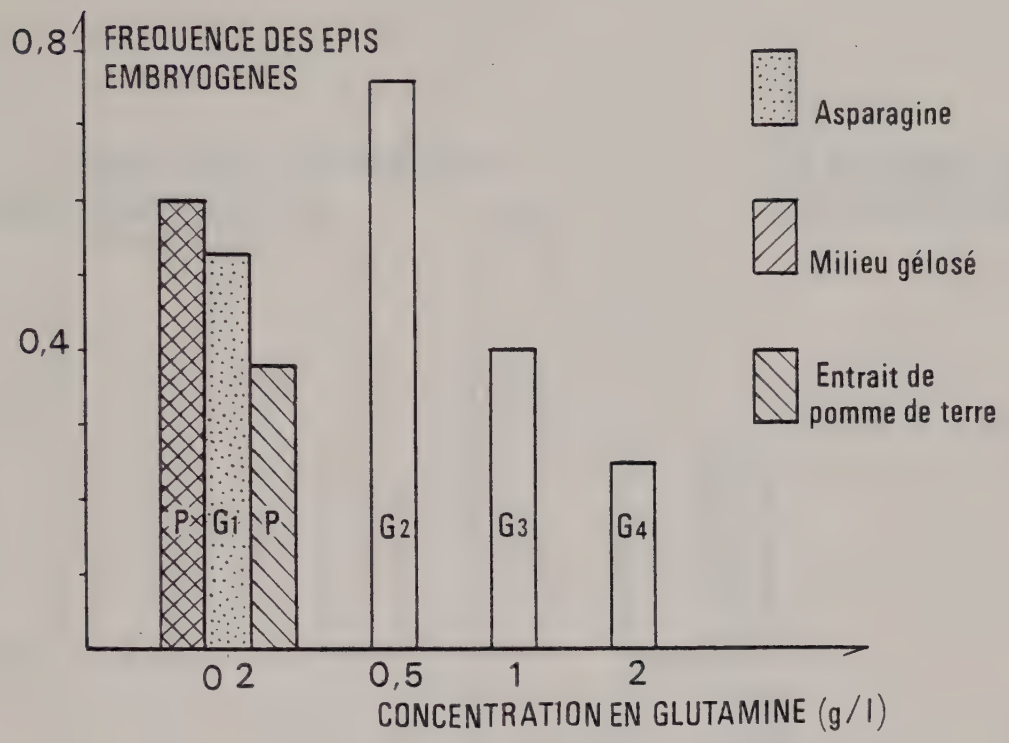
Milieux	P_1	P_2	P_3	P_{4A}	P_{4B}	B_4
Durée de conservation des tubercules (mois)	0	3	5	7	7	5
NA	74 975	52 054	31 203	83 355	62 233	20 338
NE	914	856	571	1 063	410	172
%	1,22 f	1,64 g	1,82 h	1,27 f	0,66 d	0,84 e

c) 1980 :

Périodes	1 au 3/4		8 au 11/4		22/5 au 2/6		
Milieux	P	P_1	P	G_3S	P	PG_3	PM
Nombre d'épis cultivés	203	126	277	178	83	100	92
Nombre d'épis embryogènes	77	78	169	134	51	65	56
%	37,9 j	61,9 k	61,0 k	75,2 l	61,4 k	65,9 l,k	60,9 k

a,b - d,e,f,g,h - j,k,l : significativement différents au seuil 5 %.

Figure 4 : Efficacité comparée des milieux liquides :



produisent à la fois plus d'embryons et une fréquence plus élevée d'embryons présentant un méristème caulinaire.

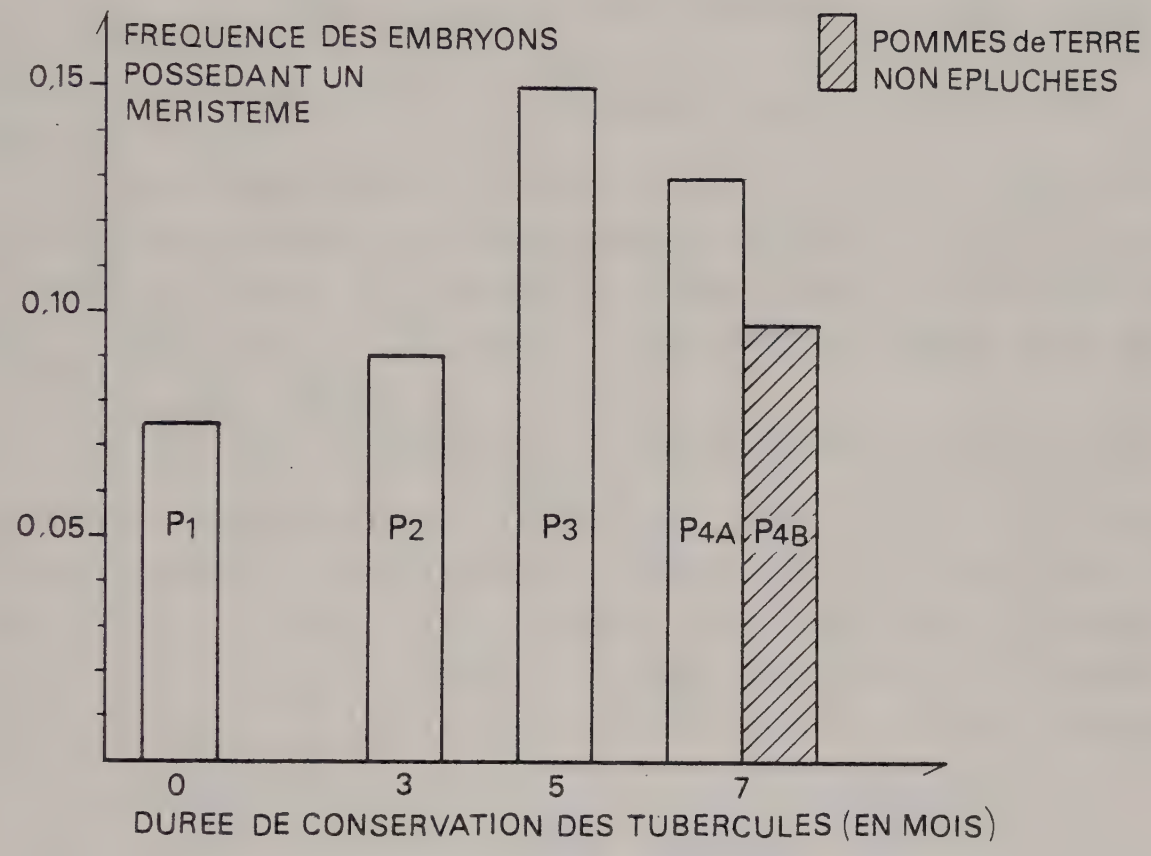
Différentes techniques de culture in vitro sont décrites dans la littérature (NITSCH 1977 (673) - PAN et coll 1975 (718) - RASHID et STREET 1981 (793) - BERNARD 1980 (93). Les très nombreux travaux effectués sur les milieux de culture permettent de classer les espèces en deux groupes :

- Celui où les premiers stades de l'embryogenèse peuvent se dérouler en l'absence de tout milieu de culture (NITSCH 1971 (666). L'effet de conditionnement des parois de l'anthère est donc très important. C'est le cas du Tabac (PELLETIER (738).
- Celui où une auxine forte et une concentration élevée en saccharose sont actuellement nécessaires pour induire le phénomène, comme dans le cas du Blé tendre.

Il apparaît donc que le milieu de culture peut jouer un double rôle : induction du phénomène et maintien des divisions embryonnaires/

Comme chez la plupart des monocotylédones (NITSCH 1977 (673),

Figure 5 : Qualité des embryons en fonction du milieu de culture.



la culture d'anthères de Blé nécessite du 2,4-D durant la phase d'induction. L'absence ou la suppression du 2,4-D avant 12 jours de culture, bloquent l'embryogenèse (HENRY et DE BUYSER 1981 (397). Ces résultats confirment l'utilité du 2,4-D jusqu'à un stade voisin de celui de la sortie des embryons polliniques de l'exine.

De même une concentration élevée en saccharose est nécessaire durant la phase d'induction. Le sucre peut jouer un rôle nutritif comme source de carbone ou agir au niveau de la pression osmotique.

Un troisième constituant des milieux de culture semble indispensable: en effet une concentration insuffisante en Fer EDTA entraîne un blocage des embryons au stade globulaire (NITSCH 1969 (660) - VAGERA et al. 1979 (1023) - HAVRANEK et VAGERA 1979 (382) - HEBERLEE 1980 (387).

Les solutions minérales utilisées en culture d'anthère de Blé sont très variables : Muraschige et Skoog (CHU C.C. et coll 1973 (167) - OUYANG et coll 1973 (714) - WANG et coll 1973 (1054), Miller (PICARD et DE BUYSER 1973 (743), N6 (PAN et coll 1975 (718) - CHU C.C. 1978 (170) - SHIMADA 1981 (867), Pdt2 (CHUANG et coll 1978 (171), C1 (WANG P. et CHEN 1980 (1061) - WEI 1982 (1066). L'apport de $(NH4)_2SO4$ et de KNO3 apparaît comme important (CHU C.C. 1978 (170).

Les éléments minéraux ont pu être complètement remplacés par de l'extrait de pomme de terre (ANONYMES 1976 (27). Lors de nos propres expériences, nous avons pu également constater l'intérêt du milieu à base d'extrait de pomme de terre (ANONYMES 1976 (27) - HU et coll 1978 (430), souvent supérieur aux milieux synthétiques traditionnels, en ce qui concerne la fréquence des embryons et leur qualité. Cependant quelques fois, des résultats contradictoires sont obtenus. Nous pensons qu'ils peuvent être liés soit à la variété de pomme de terre utilisée, soit à la durée de conservation des tubercules. Les auteurs chinois ont montré l'existence d'un effet variété (CHUANG et coll 1978 (171). Pour notre part, nous avons constaté que les rendements en androgenèse pouvaient varier en fonction de la durée de conservation des tubercules (DE BUYSER et HENRY 1980 (213). Plus la conservation est longue, et plus le rendement baisse (WENZEL et coll. 1976 (1077). Il n'est pas simple d'analyser l'extrait de pomme de terre, compte

tenu du nombre de ses constituants et de leur évolution pendant la conservation des tubercules.

Parmi les autres constituants des milieux de culture, certains acides aminés peuvent jouer un rôle important au cours de l'androgenèse (WERNICKE et KOHLENBACH 1977 (1092) - SANGWAN 1978 (829) - SANGWAN 1978 (830) - HORNER et PRATT 1979 (424) - NITSCH et GODARD 1979 (675) - CHEN Y. et coll. 1980 (148). Pour la culture d'embryons haploïdes d'Orge obtenus par croisement interspécifique, JENSEN utilise 11 acides aminés pour son milieu (JENSEN 1976 (468). De même les tubercules de pomme de terre contiennent de nombreux acides aminés et amides. Les extraits d'anthères embryogènes sont riches en glutamine et en sérine (NITSCH 1974 (671) - NITSCH 1977 (673) - HORNER et PRATT 1978 (424) - WEATHERHEAD et HENSHAW 1979 (1070). Ces résultats expliquent que l'addition de glutamine dans le milieu de culture, peut permettre de remplacer partiellement l'extrait de pomme de terre (HENRY et DE BUYSER 1981 (397) - DE BUYSER et HENRY 1980 (213). La glutamine semble donc être très importante (NITSCH 1977 (673) - MIAO et coll 1978 (582) - RASHID et REINERT 1981 (793) sans pour autant suffire seule, à induire l'androgenèse (WERNICKE et KOHLENBACH 1977 (1092). La glutamine pourrait agir comme source d'azote.

L'agar, utilisé pour solidifier les milieux est relativement toxique (WERNICKE et KOHLENBACH 1976 (1091) - SUNDERLAND 1978 (949) et entraîne l'avortement de nombreux embryons (KOHLENBACH et WERNICKE 1978 (513). La purification de l'agar ou l'utilisation d'agarose (WERNICKE et KOHLENBACH 1976 (1091) permettent une augmentation de rendement sans améliorer la qualité des embryons. Ces résultats expliquent que de nombreux auteurs trouvent les milieux liquides plus efficaces que les milieux gélosés (WANG C.C. et coll 1981 (1060) - SUNDERLAND et ROBERTS 1977 (946). Pour notre part, nous n'avons pas trouvé de milieux liquides plus performants que nos milieux gélifiés à l'agarose. Tout au plus, certains milieux liquides peuvent être équivalents aux milieux à base d'extrait de pomme de terre; cependant ils sont d'un maniement plus délicat.

Notons enfin que l'effet "milieu de culture" associe l'effet propre au milieu de culture à l'effet "volume". Ce dernier pouvant être considéré comme le rapport entre le volume de milieu et le

volume de la phase gazeuse contenue dans la boîte de pétri. Cet aspect n'est pas souvent pris en considération. Il semble cependant quela composition et le volume de la phase gazeuse jouent un rôle (DUNWELL et ROBERTS 1975 (276) - DUNWELL 1979 (281). La concentration en gaz carbonique paraît être assez importante (JOHANNSSON et coll 1982 (472). C'est ainsi que l'effet repiquage observé en culture d'anthères pourrait être lié en partie à la modification de la phase gazeuse lors de l'ouverture de la boîte. Chez le Blé, cette ouverture des boîtes de pétri en cours de culture, sans repiquage des anthères, a un effet positif sur le rendement en embryons.

L'utilisation de milieux solides ne permet guère de modifications en cours de culture. Aussi, la culture de microspores isolées (NITSCH 1974 (671) ou de jeunes embryons suscite un grand intérêt. D'une part, elle permettrait de vérifier le rôle des tissus de l'anthère et,d'autre part,il serait possible de modifier les constituants du milieu en cours de culture. En effet, le passage progressif d'un milieu favorable à l'induction à un milieu de régénération devrait permettre un gain de rendement, en augmentant le taux de survie des jeunes embryons et leur "qualité".

Au cours de cette analyse, nous nous sommes attachés à montrer le rôle important du milieu de culture. Cependant, celui-ci ne doit pas être le facteur déterminant de l'androgenèse, puisque l'analyse montre que la variance liée au matériel de départ est supérieure à la variance liée aux milieux de culture (ANONYMES 1978 (38). Le rôle du milieu de culture est de permettre le développement d'un plus ou moins grand nombre d'embryons. Malgré tout,un effort doit être entrepris, car si 10 à 25 % des microspores peuvent parvenir à un stade d'embryons jeunes avec 20 à 30 cellules, il est exceptionnel d'observer 27 embryons sortant d'une anthère (2 % des microspores). Aussi nous pensons que nos travaux doivent porter davantage sur la survie des jeunes embryons plutôt que sur la phase d'induction de l'androgenèse.

C. Influence du contexte génétique :

L'ensemble des résultats obtenus de 1976 à 1981 indiquent qu'en moyenne, le rendement en embryons est plus élevé pour les générations précoces en sélection, que pour le matériel plus avancé (Tableau 10). Les 70 origines testées ont toutes fourni des

embryons. Nous constatons cependant que les variations du pourcentage d'embryons sont plus importantes pour les F_5-F_6-F_7 :
- 0,08% à 9,01% en F_5 à F_7;
- 0,26% à 4,15% en F_1.

En outre, le meilleur matériel (B_1) est une lignée relativement avancée (F_8) (Annexe 12).

En ce qui concerne les F_1 qui possèdent un parent commun (Tableau 11), les taux d'embryons peuvent être identiques ou varier du simple au double. Ceci confirme l'existence d'effets génotypiques. Enfin, l'on observe des différences considérables pour des lignées soeurs provenant d'un croisement (Tableau 12). Ceci se comprend pour la lignée B_{112}, isolée des deux autres en F_5, mais B_{134} et B_{156} n'ont été séparées qu'en F_7 et diffèrent sensiblement. La sélection peut avoir un effet inverse, puisque 78035 (F_4) est plus efficace que D_1 (F_1).

Tableau 10 : Pourcentage d'anthères embryogènes en fonction de la génération de sélection :

Génération de sélection	F_1	F_2-F_3-F_4-BC_1	F_5-F_6-F_7
Nombre de génotypes testés	11	35	24
Pourcentage moyen d'anthères embryogènes	1,61 % a	1,67 % a	1,29 % b

a,b : significativement différents au seuil 5 %

Tableau 11 : Pourcentage d'anthères embryogènes de F_1 ayant un parent commun :

Parent commun	Femelle						Mâle			
Origines	D_1	D_2	D_4	D_5	D_6	D_7	D_6	D_8	D_7	D_9
Croisement	AxE	AxF	GxH	GxI	BxC	BxD	BxC	JxC	BxD	KxD
Embryons pour 100 anthères	1,1 c	1,1 c	0,5 a	0,7 b	3,- f	2,2 e	3,- f	2,- d	2,2 e	4,1 g

A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K : lignées.
a,b,c,d,e,f,g : significativement différents au seuil 5 %.

Tableau 12 : Pourcentage d'anthères embryogènes : a) de trois lignées provenant du même croisement, et b) des générations F_1 et F_4 d'un second croisement :

a) Origine testée	B_{112}	B_{134}	B_{156}
Génération de sélection	F_8	F_8	F_8
Embryons pour 100 anthères	1,4 a	7,0 b	20,1 c

b) Origines testées	D_1	78035
Génération de sélection	F_1	F_4
Embryons pour 100 anthères	1,1 e	2,3 f

a,b,c - e,f : significativement différents au seuil 5%.

Lorsque nous condidérons l'ensemble des génotypes, le rendement moyen en embryons varie (Annexe 12) de 1 à 76. Par contre, au niveau des meilleurs épis, cette variation n'est plus que de 1 à 12. Les potentialités de tous les génotypes sont donc élevées.

Tous les travaux réalisés en culture d'anthères montrent une forte influence du génotype sur le taux d'embryons, que ce soit chez le Blé -OUYANG et coll.(714), DE BUYSER et HENRY (210), SCHAEFFER et coll. (838) -, le Mais -MIAO et coll. (582)-, la Pomme de terre -PHILIPS et coll. (741)-, le TRITICALE -BERNARD et coll. (90), et bien d'autres espéces. Il est d'ailleurs possible de sélectionner à partir de variétés des génotypes plus performants - PICARD et DE BUYSER (749), WENZEL et UHRIG (1088). Cependant, les effets génotypiques ne semblent pas résulter d'effets géniques - FOROUGHI-WEHR et coll. (311) - ou cytoplasmiques - PICARD, DE BUYSER et HENRY (751) , DEATON et coll. (205) - directs pour l'aptitude à l'androgenèse, mais peuvent provenir d'effets physiologiques. Parmi les facteurs susceptibles de varier, nous pensons à l'aptitude des génotypes à s'adapter

aux conditions de culture en serre ou aux champs (vigueur végétative, durée de la phase végétative, durée de la phase comprise entre la méiose et la mitose pollinique, niveaux endogènes et évolution des substances telles que les auxines, les cytokinines et les acides aminés). Remarquons également que chez le Blé, nous prélevons une inflorescence, d'où la difficulté de repérer le stade optimal de mise en culture (synchronisation entre les différentes fleurs, non seulement au niveau cytologique, mais également au niveau physiologique).

Ainsi, chez le Blé, pour les rendements moyens en embryons, les génotypes répondent de façons très différentes à la culture d'anthères. Ces différences deviennent moins perceptibles (6 à 7 fois moins fortes) au niveau des meilleurs épis de chaque génotype.

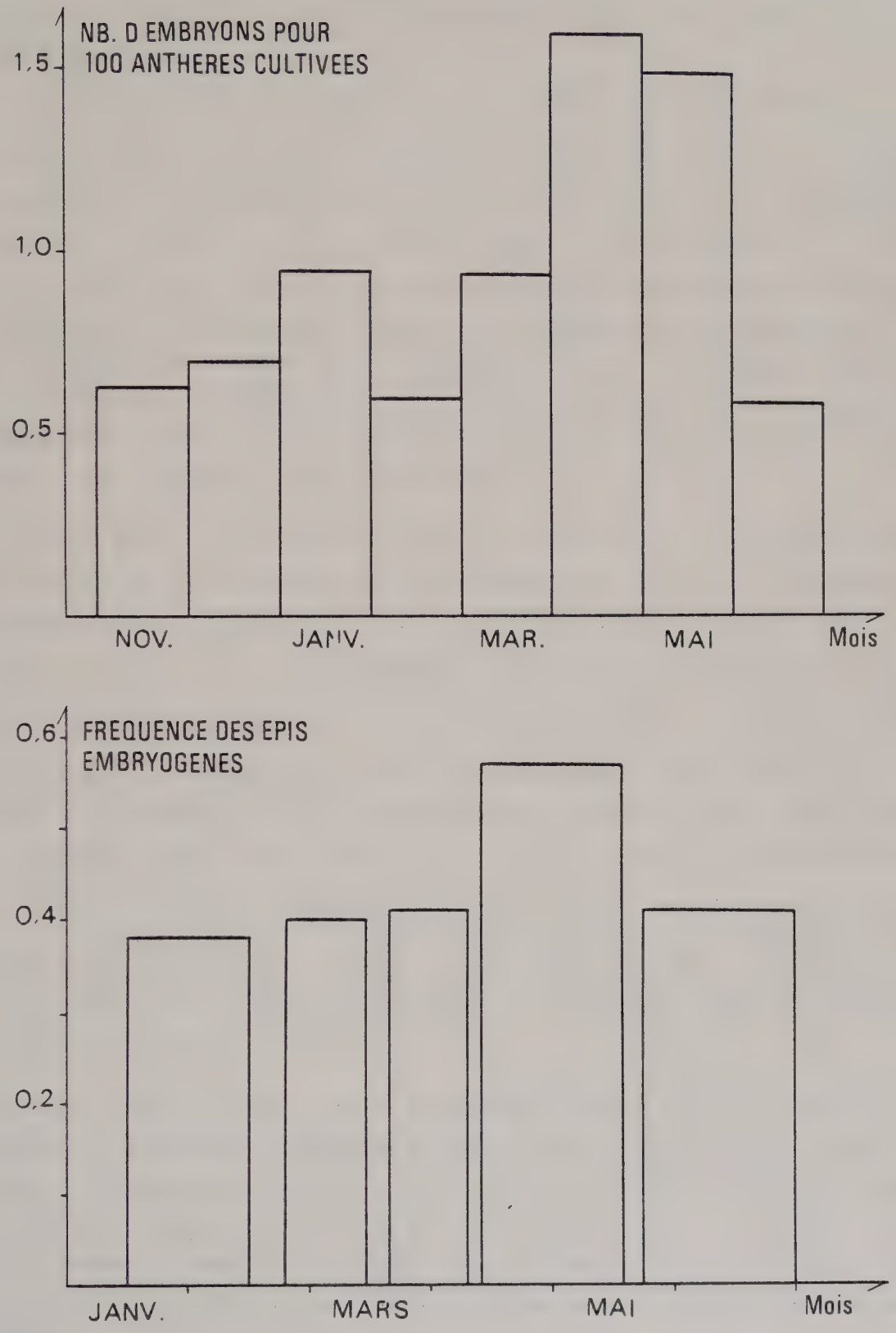
Chez le Riz (OONO 1975 (709), le taux d'embryons diminue lorsque l'on tend vers l'homozygotie, et dans le cas du Petunia il est directement lié à l'hétérozygotie de la plante mère (RAQUIN 1982 (787). Chez le Blé, nous avons noté un net avantage moyen des niveaux les plus hétérozygotes. Ces résultats sont confirmés par les travaux des chercheurs chinois (WANG et coll 1973 (1054) - HU 1978 (431). Ce phénomène pourrait s'expliquer par un plus large éventail de génotypes en F_1-F_2, cependant il ne faut pas négliger le rôle des tissus diploïdes de l'anthère qui peuvent être de meilleures nourrices chez les plantes hétérozygotes.

Dans le cas particulier du Blé, qui possède 3 génomes (A,B et D), nous observons que certaines lignées (B_1 par exemple) produisent de très forts taux d'embryons. Ceci pourrait résulter d'une hétérozygotie des génomes homéologues, liée à la présence d'un fragment de chromosome de seigle.

D. Etude de différents facteurs :

+ Influence de la saison : Nous avons observé, à milieu gélosé constant, des variations mensuelles du taux d'embryons et du pourcentage d'épis efficaces à partir de matériel cultivé en serre (Figure 6 et Annexe 13). En 1976, nous avons montré que les périodes les plus favorables à l'androgenèse étaient les mois d'avril et de mai. Les résultats de 1980 montrent que le pourcentage d'épis embryogènes augmente aussi durant cette période.

Figure 6 : Variations saisonnières de l'efficacité en androgenèse.



+ Influence de l'éclairement reçu par les plantes mères : En 1979, nous avons noté l'ensoleillement en serre, durant les jours qui ont précédé le jour du prélèvement des épis. Nous avons considéré deux cas :

. Un jour de soleil suivi de 1 à 5 jours de temps couvert;

. Un jour de soleil suivi de 1 à 5 jours de temps ensoleillé.

Bien que les variations soient relativement faibles, le Tableau 13 indique qu'un prélèvement effectué 4 jours après une journée de soleil suivie d'une période de temps couvert donnait les meilleurs résultats. Par contre, lorsque l'ensoleillement est continu, on observe une diminution sensible du rendement en embryons. L'ensoleillement au moment de la méïose est donc un facteur favorisant. Par contre, lorsque l'ensoleillement est continu, il s'accompagne dans nos conditions de serre d'une forte élévation de la température, qui apparaît très défavorable.

+ Effet épi : La distribution du nombre d'épis présentant de 0 à 26 anthères embryogènes ne correspond pas à une loi de Poisson de moyenne 1,23 (Figure 7). Beaucoup trop d'épis ne sont pas efficaces, de même il y a un excédent d'épis qui possèdent plus de 6 anthères embryogènes. La distribution du nombre d'anthères embryogènes par épi varie en fonction du taux d'embryon des génotypes (Figure 8 et Annexe 14). Les deux meilleurs génotypes se comportent différemment, l'un présente un excédent d'épis dont plus de 6 anthères sont embryogènes, et l'autre une forte proportion d'épis dont deux anthères sont efficaces.

Au cours de nos travaux d'androgenèse, les deux meilleurs épis nous ont fourni respectivement 31,7 et 36 % d'anthères embryogènes, et un épi nous a donné 64 embryons pour 37 anthères mises en culture (173 %).

+ Effet fleur : Nous avons également étudié la distribution du nombre d'anthères embryogènes par fleur (Tableau 14). Nous constatons un excédent de fleurs qui présentent deux anthères embryogènes par rapport à l'effectif théorique. Ceci confirme que les 3 anthères d'une fleur n'ont pas la même efficacité. En outre, il est rare d'observer des fleurs présentant 2 ou 3 anthères embryogènes.

+ Effet anthère : La distribution du nombre d'embryons par anthère embryogène (Figure 9 et Annexe 15) varie en fonction du taux d'anthères embryogènes. Seul l'un des génotypes présente une proportion importante d'anthères contenant plus de 4 embryons. Ces données sont confirmées par les résultats obtenus chez le Riz, où la probabilité d'obtenir un cal n'est pas la même pour toutes les anthères CHALEFF et STOLARZ 1981 (131).

Tableau 13 : Influence d'éclairement.

	Ensoleillement	+	-	-	-	-	-
Ensoleillement nul	Jours de prélèvement des épis	J	J + 1	J + 2	J + 3	J + 4	J + 5
	NA	41562	44544	41322	49372	32699	43481
	NE	463	536	472	563	428	524
	%	1,11	1,20	1,14	1,14	1,30	1,20
		ac	ab	ab	ab	b	ab
	Ensoleillement	+	+	+	+	+	+
Ensoleillement continu	Jours de prélèvement des épis	J	J + 1	J + 2	J + 3	J + 4	J + 5
	NA	18336	18758	15468	11235	10482	9642
	NE	201	167	158	118	81	78
	%	1,09	0,89	1,02	1,05	0,77	0,80
		ac	c	ac	ac	d	d

Figure 7 : Distribution du nombre d'anthères embryogènes par épi mis en culture.

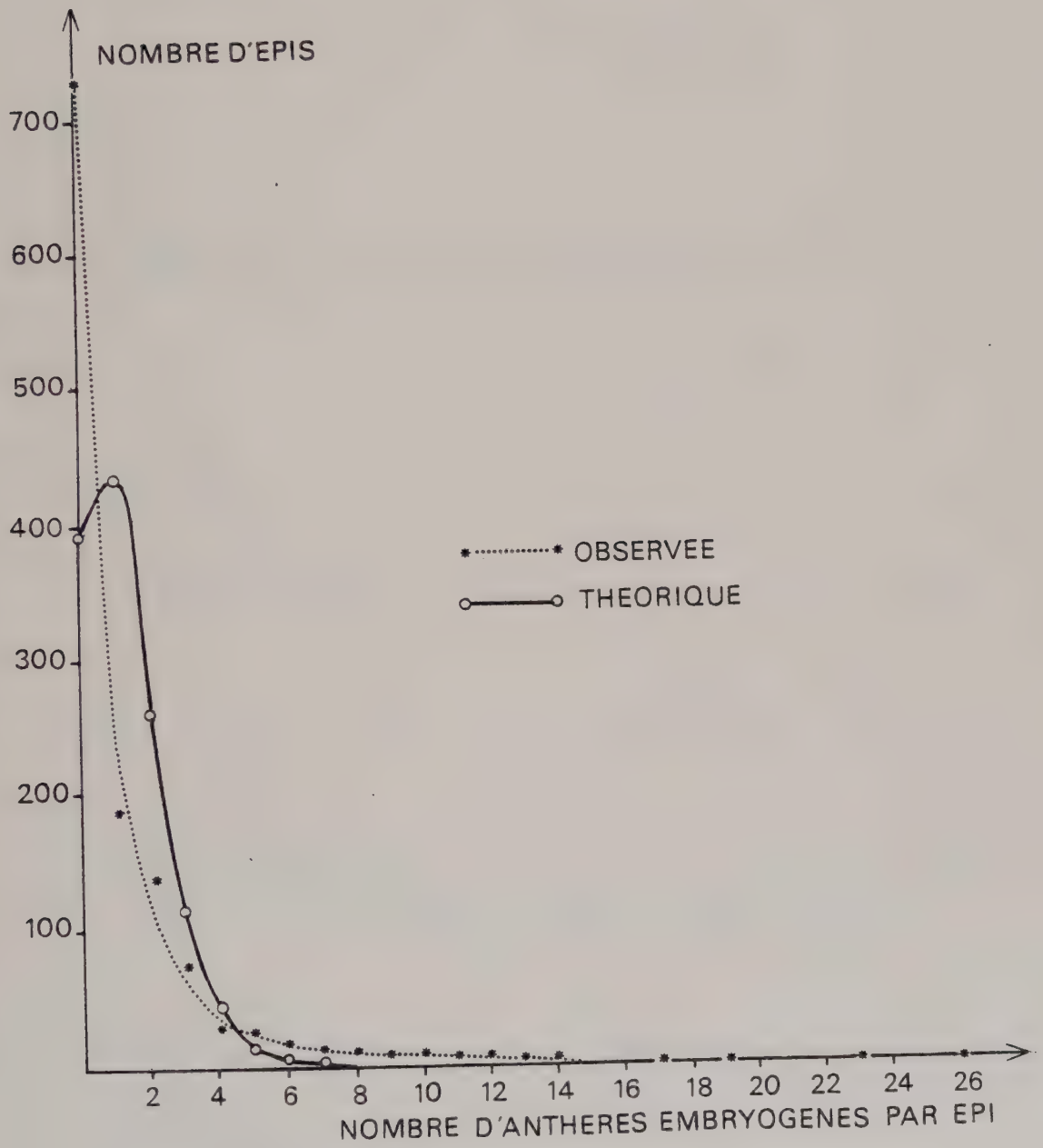


Figure 8 : Distribution du nombre d'anthères embryogènes par épi.

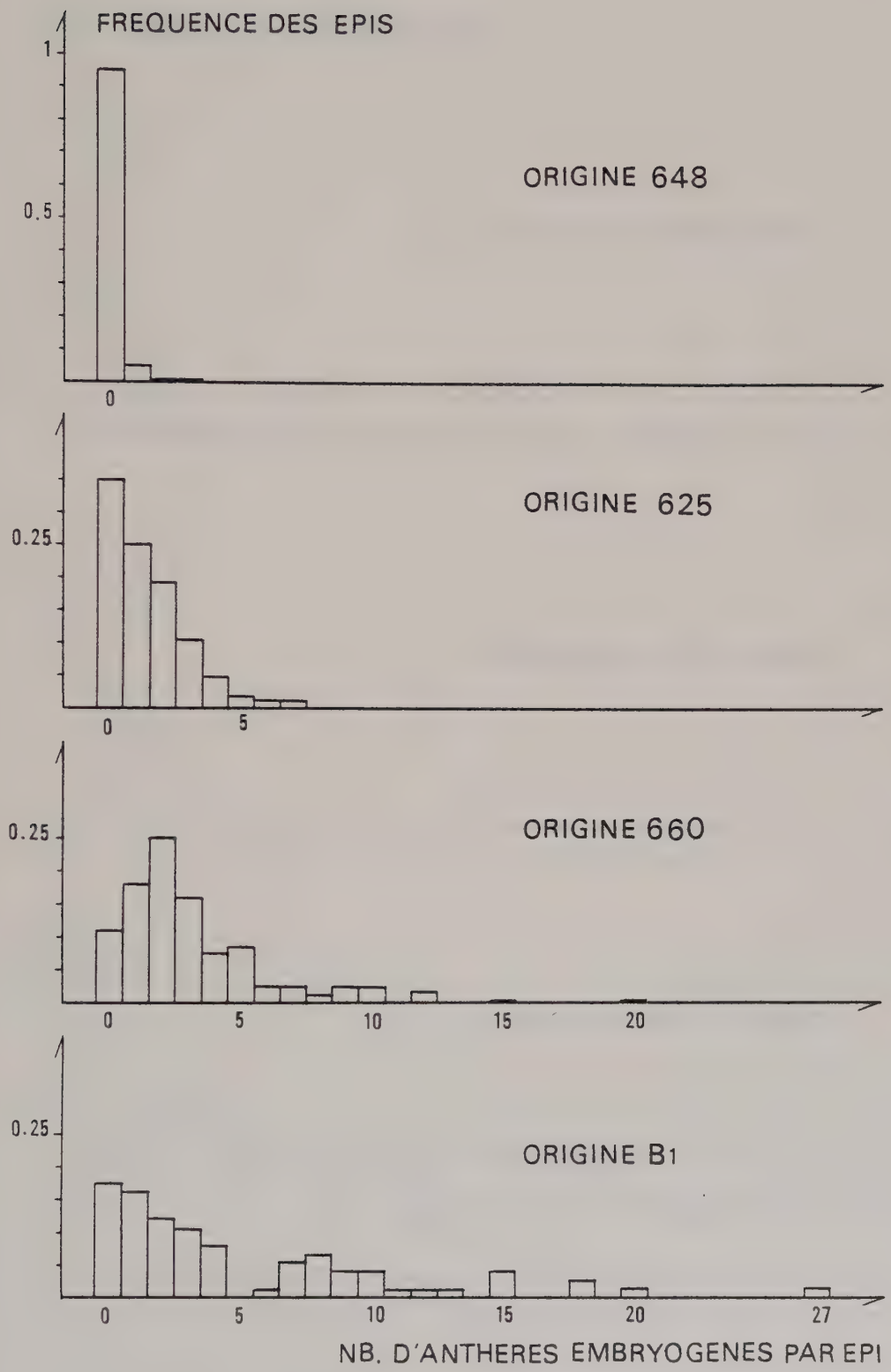


Figure 9 : Distribution du nombre d'embryons par anthère embryogène.

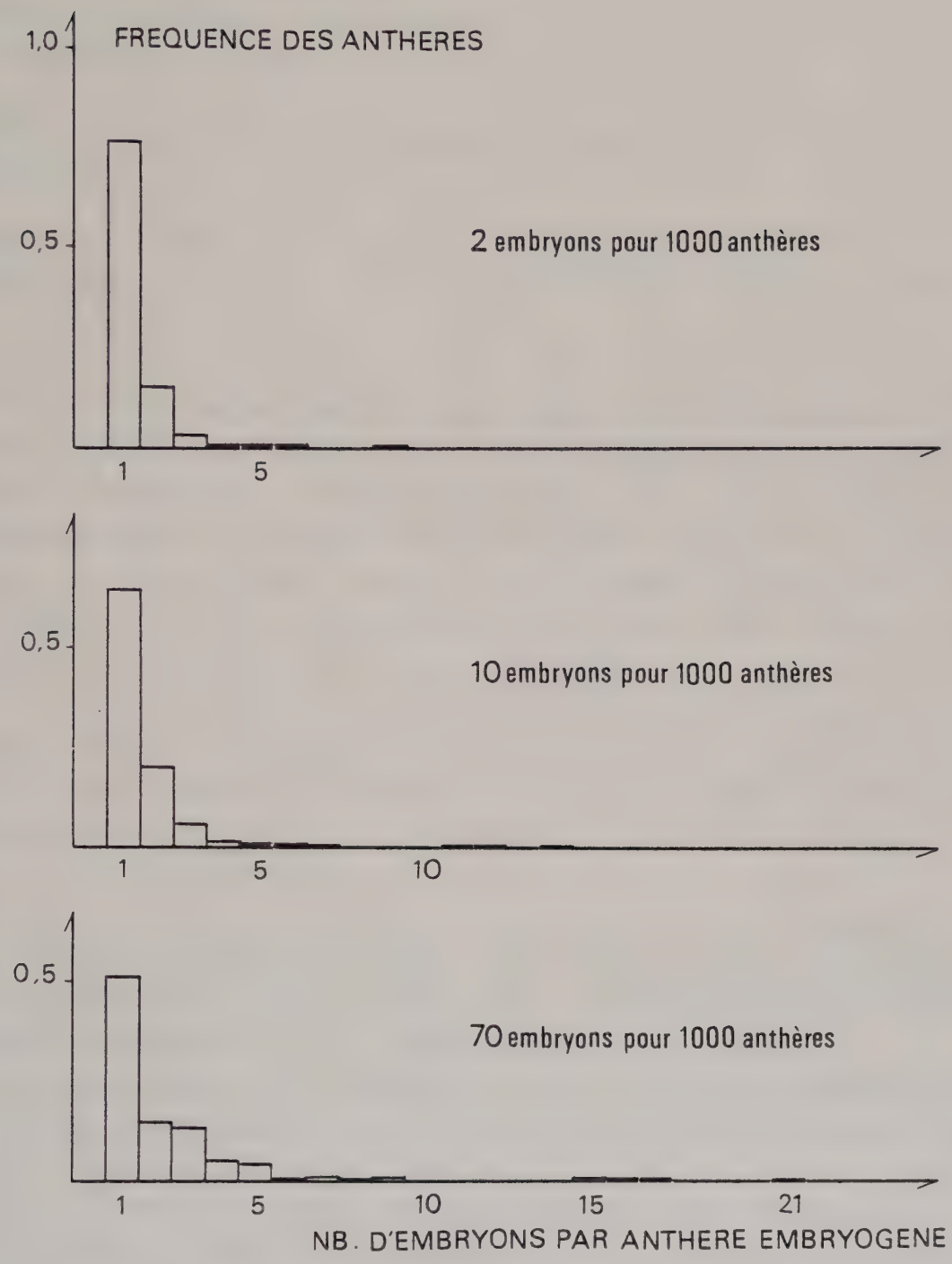


Tableau 14 : Effet fleur, distribution du nombre d'anthères embryogènes par fleur.

Nombre d'anthères embryogènes par fleur	0	1	2	3
Nombre de fleurs observées	28796	1283	80	1
Nombre de fleurs théoriques	28730,4	1401,7	27,8	0,1

+ Effet des prétraitements : Le premier choc inducteur de l'androgenèse est la séparation de l'inflorescence de la plante entière. Ceci ne présentera l'effet souhaitable que si les anthères sont compétentes et les microspores réceptives (PELLETIER et ILAMI 1972 (734). A la suite des travaux réalisés chez le Datura (NITSCH et NORREEL 1973 (670), de nombreux auteurs ont défini divers prétraitements, en vue de stimuler l'androgenèse :

- La pulvérisation d'éthrel sur des inflorescences avant la méïose, peut induire des mitoses surnuméraires in situ (BENNET et HUGHES 1973 (88) - PEARSON et NILAN 1975 (729). Le même phénomène peut s'observer à la suite de traitements à basse température lors de la méïose (SAX 1935 (837).
- L'utilisation de radiations ionisantes ou d'un mutagène chimique peuvent également induire une stimulation des premières phases du développement (MONDEIL 1974 (612) - PRIMO MILLO et SUNDERL 1975 (756) - PRZEWOZNY et coll 1980 (757).
- Le prétraitement des anthères de Blé par une solution hypertonique de saccharose (0,814) durant 10 à 60 mn semble très efficace (WANG C.C. et coll 1981 (1060).
- La centrifugation des anthères (BONGA et MAC INNIS 1975 (104)
- SANGWANN et NORREEL 1977 (831) augmente le taux d'anthères embryogènes et le nombre de plantules par anthère (TANAKA 1973 (972). Cela semble en outre fournir des embryons de meilleure qualité qui régénèrent mieux (PAN et GAO 1978 (720).
- Le traitement des anthères mises en culture à une température de 30 à 40° C stimule le rendement (KELLER et ARMSTRONG 1978 (495) -

KELLER et ARMSTRONG 1979 (498) - DUMAS DE VAULX et coll 1980 (264) - OUYANG et coll 1980 (715).

- Les prétraitements des anthères, boutons floraux ou inflorescences entières par des températures comprises entre 3 et 13° C (NITSCH et NORREEL 1973 (670) - CHALEFF et coll 1975 (130) - GENOVESI et MAC GILL 1979 (329) - CHEN et coll 1980 (148) ont été fréquemment utilisés. Chez l'Orge, le prétraitement des épis est plus efficace que celui de la talle entière (SUNDERLAND et coll 1979 (955) - HUANG et SUNDERLAND 1980 (440); il doit être réalisé en athmosphère saturée d'eau (DUNWELL 1981 (283). Ces prétraitements permettent un fort accroissement du rendement de l'androgenèse (PAN et coll 1975 (718) - WENZEL et coll 1977 TAG (1078). Ils sont indispensables aux cultures de microspores (NITSCH 1977 (673).

Dans le cas du Blé, les talles trempant dans l'eau sont stockées à 3° C. Ce prétraitement assure un stockage aisé du matériel (jusqu'à plusieurs mois), permet d'obtenir un taux d'embryons plus fort (PICARD et DE BUYSER 1975 (746) et induit un taux plus élevé de doublements spontanés du stock chromosomique (AMSSA et coll 1980 (12).

L'analyse du mode d'action du froid montre :

- une efficacité maximale à contre-saison (PICARD et DE BUYSER 1975 (746) - CHALEFF et STOLARZ 1981 (131).
- que la gamme des stades de mise en culture peut être élargie (NITSCH 1975 (1212).
- des modifications au niveau de la structure des microspores (CAMEFORT et SANGWAN 1979 (125).
- une augmentation de la teneur en acides aminés dans l'anthère (SANGWAN et CAMEFORT 1978 (828).
- une diminution de la teneur en acide abscissique des parois de l'anthère (JOHANNSON et coll 1982 (482).
- une augmentation de la fréquence des parois inductrices et un accroissement de l'efficacité de l'induction (PELLETIER et HENRY 1974 (736) - DUNCAN HEBERLEE 1976 (267) - CHEN Y et coll (153.
- un retard dans la sénescence des parois de l'anthère (PELLETIER et HENRY 1974 (736) - SUNDERLAND et ROBERTS 1979 (953).
- l'effet sur la première division dépend du stade de la microsporogenèse (PELLETIER et HENRY 1974 (736) - NITSCH 1974 (671) - DUNCAN et HEBERLEE 1976 (267).

L'augmentation du nombre de proembryons (NITSCH et NORREEL

1973 (670), la diminution de la mortalité et l'accélération du processus -SUNDERLAND 1977 (947) , SUNDERLAND 1978 (949)-, se traduisent par un gain de rendement sensible.

De nombreuses publications font référence à l'influence de la "qualité" des plantes mères sur la réussite de l'androgenèse -DUNWELL 1976 (279) , PHILIPS et coll 1979 (741)-, alors que ce point n'est que rarement abordé dans les travaux conduits en culture de tissus, de cellules et de protoplastes végétaux. Malheureusement, il ne s'agit souvent que d'observations ponctuelles et l'étude des mécanismes n'est pas abordée.

Les principaux points traités ont permis de souligner le rôle des conditions de culture des plantes mères (BERNARD 1977 (91) - SUNDERLAND 1978 (949) - NITSCH GODARD 1979 (675) - HEBERLEE - BORS 1982 (391-392) et plus particulièrement l'influence négative sur la production d'embryons :

- des traitements antiparasitaires (NITSCH et GODARD 1979 (675);
- des basses températures et de la chaleur (PRIMO MILLO et SUNDERLAND 1975 (756) - FOROUGHI et MIX 1979 (310) - HEBERLEE-BORS et REINERT 1979 (385);
- de l'éclairement trop intense (FOROUGHI et MIX 1979 (310 - DUNWELL 1976 (279) et de la photopériode (DUNWELL 1976 (279);
- du vieillissement des plantes mères (SUNDERLAND 1971 (929) - DUNWELL 1976 (279) et de la durée de la floraison (ANAGNOSTAKIS 1973 (14) - DUNWELL 1976 (279);
- de la nutrition minérale et azotée des plantes mères (SUNDERLAND 1978 (949) - HEBERLEE-BORS et REINERT 1979 (385);
- du matériel de serre par rapport à celui des champs (PAN et GAO 1978 (720) - WANG et CHEN 1980 (1061 - WOO et HUANG 1982 (1104).

Les variations des conditions de culture des plantes mères peuvent expliquer l'observation de très fortes variations journalières et saisonnières du taux de réussite de l'androgenèse. Il est nécessaire d'insister sur ce dernier point. Comme cela avait été pressenti chez le Datura (NITSCH et NORREEL 1973 (670), nous avons constaté chez le Blé d'importantes différences du rendement en embryons en fonction des mois (DE BUYSER et HENRY 1979 (210) - DE BUYSER et HENRY 1980 (213). De telles fluctuations ont été

signalées chez l'Orge -MIX et coll 1978 (599) et le Riz - TSAY et LIN 1976 (1004), CHALEFF et STOLARZ 1981 (131). Les conditions de culture des plantes fournissant les anthères, influent fortement sur la réussite, et plus l'on se rapproche des conditions naturelles de floraison (température, éclairement,...), plus les résultats sont bons. Il s'agit d'ailleurs, dans le cas du Blé, des conditions de printemps - PICARD et DE BUYSER 1975 (746), HESKY et MESCH 1976 (407), WANG et CHEN 1980 (1061), BAENZIGER et coll 1980 (62). Au moment du prélèvement des épis, il apparaît que "l'état physiologique" de la plante, déterminé par les conditions environnementales reçues durant son développement, joue un rôle important et conditionne le taux de réussite. Les modifications physiologiques permettent d'expliquer une partie de l'effet épi que nous avons observé; de même la viabilité du pollen est elle aussi conditionnée par l'environnement.

L'état physiologique du végétal recouvre toute une série de phénomènes : l'aptitude au tallage, la vigueur végétative, l'assimilation chlorophyllienne varient en fonction des conditions de culture des plantes mères. De même, la durée du cycle végétatif depuis le repiquage en terre jusqu'au prélèvement des épis, n'est pas constante pour toutes les plantes d'un génotype. On peut penser également que des modifications de la vitesse de migration de certaines substances (auxines, acides aminés) entre la méïose et la première mitose pollinique, existent en fonction des conditions de température. Par exemple, dans le cas des Blés mâle stériles, la proline est moins importante au moment de la mitose pollinique que chez les Blés normaux (FUKASAWA 1962 (320). Nous observons donc une action au niveau de la plante mère qui peut se traduire par des modifications au niveau des parois de l'anthère, dont le génotype ne correspond pas nécessairement à celui du pollen. Ainsi, le fait que les hybrides donnent de meilleurs résultats moyens que les lignées pourrait s'expliquer par la nature hybride des tissus de l'anthère, plus favorables à l'androgenèse.

L'état physiologique intervient également au niveau de la qualité du pollen. Ainsi la quantité de pollen (en relation avec la taille de l'anthère) varie selon la période de l'année. De même, la viabilité du pollen est fortement influencée par les conditions de culture : en début d'année (janvier, février) il est fréquent de trouver des anthères complètement stériles.

Cependant, il ne semble pas que la viabilité du pollen soit le facteur limitant en androgenèse, puisque toutes les expériences réalisées à partir de matériel haploïde, male stérile, hybride 4x par 6x montrent que les résultats sont aussi bons qu'avec les génotypes habituels.

Ces remarques justifient le fait qu'il est difficile de comparer les expériences réalisées par des auteurs différents, bien que les techniques soient identiques. La notion de rendement en androgenèse est une donnée soumise à de nombreux aléas.

Le prélèvement des épis est le moment clef pour la réussite de l'androgenèse. Il semble que ce soit le stade de la microsporogenèse qui conditionne l'efficacité du processus. Tous les auteurs s'accordent pour dire qu'il faut prélever à un stade bien précis, cependant la réalité est plus complexe. La démonstration du rôle réciproque des parois de l'anthère et de l'état du pollen permet une analyse plus précise - PELLETIER ILAMI 1972 (734).

- Les parois peuvent être inductrices ou non, le conditionnement qu'elles assurent est constant et réalisé dès le premier jour de culture - PELLETIER ILAMI 1972 (734). Le rôle de nourrice peut être effectué par des anthères d'autres espèces - BERVILLE et coll 1971 (94) - ou par différents cals somatiques - PELLETIER et DURRAN 1972 (733), PELLETIER 1972 (732), PELLETIER et FERAULT 1976 (737). Le brunissement précoce des anthères bloque l'embryogenèse MII 1980 (587), MII 1980 (588).
- Les microspores peuvent être réceptives ou non.

Ainsi, le stade optimal de mise en culture résulte du meilleur équilibre entre le stade favorable de la microsporogenèse et l'état des parois de l'anthère. Chez l'Orge, les milieux sont conditionnés par les anthères contenant des microspores binucléées - XU et SUNDERLAND 1980 (1108), XU et SUNDERLAND 1981 (1109), XU et SUNDERLAND 1982 (1111) - alors que seules les microspores uninucléées se développent en culture. Ces observations permettent d'expliquer que, pour une espèce donnée, les stades optimaux observés en cytologie optique puissent varier d'un laboratoire à l'autre ; dans le cas du Blé, certains auteurs préconisent le stade uninucléé moyen et d'autres uninucléé tardif. De même, pour des épis prélevés à un même stade cytologique, nous observons d'importantes variations dans le rendement en embryons.

Malgré tout, les limites du stade de prélèvement ne sont pas infinies. Les stades optimaux, pour la plupart des espèces sont proches de la première mitose pollinique : stade uninucléé chez les graminées - SOZINOV et coll 1981 (898) - et plus précisément en phase G2 du cycle mitotique chez le Blé - RAQUIN et coll (788) - et en G1 ou G2 chez l'Orge - SUNDERLAND et coll 1979 (955)-, stade mitose chez les Solanées - PELLETIER 1979 (738) - avec par exemple chez le Petunia - RAQUIN et coll (788) - des microspores uninucléées en G2 ou en mitose, et des pollens binucléés avec des noyaux en G1.

Le problème du stade optimal se complique également chez les espèces où le prélèvement des anthères s'effectue sur une inflorescence, et non pas sur un bouton floral. Ainsi, dans le cas du Blé, toutes les fleurs d'un épi ne sont pas au même stade lors du prélèvement, et le stade que l'on détermine n'est qu'un stade moyen. Dès lors, il n'est pas surprenant d'observer un fort effet du rang de la talle - WANG et CHEN 1980 (1061) -, de l'épi - DE BUYSER et HENRY 1979 (210) - et de larges différences entre génotypes. De même, les différents effets épillet, fleur ou anthère qui existent pour toutes les espèces sont liés en partie à l'hétérogénéité des anthères.

En définitive, le choix des épis avant la mise en culture des anthères, n'est pas aussi efficace que nous le souhaiterions puisque dans de nombreux cas, moins d'un sur deux donne des embryons. L'effet épi est en partie lié à une mauvaise appréciation du stade de développement des anthères : une analyse cytologique rapide permet cependant d'augmenter sensiblement le rendement en embryons, mais diminue notablement le nombre d'épis mis en culture par unité de temps. Aussi, dans une optique pratique et appliquée, dans la mesure où la physiologie de l'épi n'est pas connue, il s'avère plus rentable de laisser le choix du stade de prélèvement à l'habitude du manipulateur et à son appréciation personnelle, plutôt que de faire appel à des techniques certes plus efficaces, mais trop longues.

Si le taux d'embryons semble être un facteur limitant dans l'androgenèse du Blé tendre, les potentialités de la technique sont néanmoins très élevées. Il est ainsi possible d'observer dans certaines anthères jusqu'à plusieurs centaines d'embryons après deux semaines de culture (5 à 25 % des microspores), et jusqu'à la sortie de 40 embryons d'une anthère (soit 2 % des microspores).

II. REGENERATION DES PLANTES : Dans le cas des Solanacées ,en général, la régénération est une phase qui n'existe pas en culture d'anthères, puisque les microspores poursuivent dès le stade 16 cellules, un développement embryonnaire tout à fait identique à celui des embryons zygotiques - NITSCH 1970 (664), NORREEL 1970 (682), CHU et coll (169). Chez les Graminées par contre, la formation de cals chez le Riz - NIIZEKI 1968 (636) - et l'Orge - CLAPHAM 1971 (172) - ou celle d'embryons chez le Seigle - WENZEL et coll 1976 (1077) - et le Blé - DE BUYSER et HENRY 1979 (210) - correspond à la première phase du processus. Les embryons de Blé ne produisent pas de plantes lorsqu'ils demeurent sur le milieu de culture des anthères. Il est donc nécessaire d'effectuer un repiquage sur un milieu différent. Diverses évolutions sont alors observées : certains embryons se nécrosent, d'autres fournissent des racines ou des plantes albina, et dans les meilleurs cas, nous obtenons des plantes chlorophylliennes enracinées. Celles-ci présentent différents aspects, mono ou pluritalles (Figures 10 et 11). Dans le cas du Blé, jusqu'à présent, seuls les embryons peuvent se développer car les cals d'origine pollinique demeurent non morphogènes.

Au niveau de la régénération, nous avons également travaillé à la mise au point de milieux gélosés plus performants, et nous avons pu constater le rôle joué par certains facteurs comme l'âge et la qualité des embryons, le génotype et le niveau de sélection.

a) Influence du milieu de régénération : Au cours des années successives, nous avons testé différents milieux de régénération (Annexe 5).

Nous avons montré que le milieu à base d'extrait de pomme de terre RP est plus efficace que les milieux synthétiques habituellement utilisés (Tableau 15). La présence de glutamine, d'AIA et d'agarose semble favorable. Par contre la zéatine s'est révélée toxique dans nos essais. Une faible concentration en 2,4-D n'inhibe pas la régénération des embryons. Enfin, le repiquage des embryons après une semaine passée sur milieu de régénération contenant du 2,4-D n'apporte aucune amélioration (Tableau 15).

Les milieux liquides ne permettent pas d'obtenir un taux de régénération plus élevé (Tableau 16), mais accélèrent le processus et favorisent le développement du système racinaire. Par ailleurs,

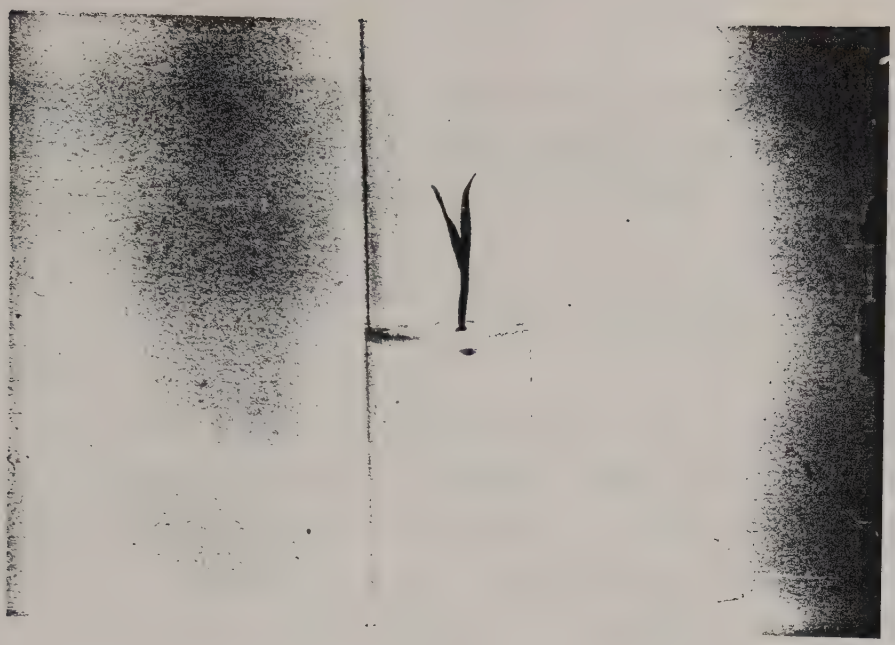


Figure 10 : Plantule chlorophyllienne.

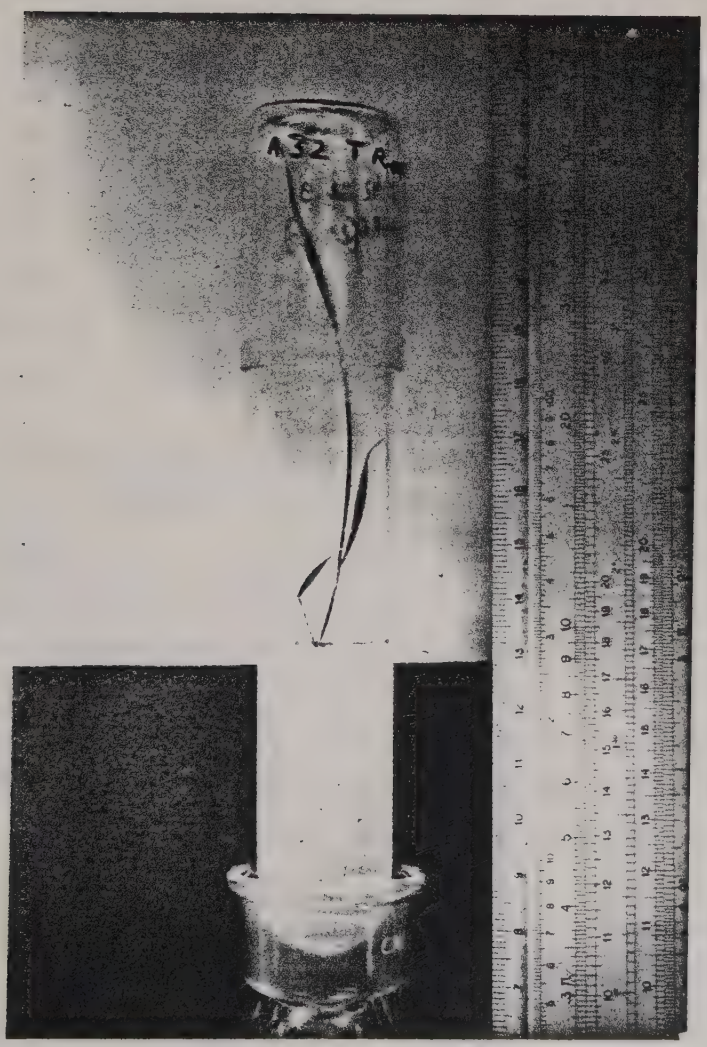


Figure 11 : Plantule chlorophyllienne.

la régénération est plus fréquente en boîtes de Pétri qu'en tubes plastiques (Tableau 17). Ceci indique que le rôle joué par le volume gazeux, ou sa composition, est très important pour la régénération.

En définitive, actuellement, le milieu de régénération le plus couramment utilisé reste le milieu à base d'extrait de pomme de terre, en boîtes de Pétri.

Les conditions de régénération comme la température - PICARD et DE BUYSER 1975 (747), BERNARD 1980 (93) - la lumière - NITSCH 1982 (677) - et le milieu gélosé - CRAIG 1974 (199), CHUANG et coll 1978 (171), CHAEFFER et coll 1979 (838), KAO 1981 (479) - font varier le taux de régénération. La caractéristique générale des milieux de régénération utilisés chez le Blé est la faible teneur en saccharose (20 à 30 g/l), et la suppression des auxines fortes. Par ailleurs, chez l'Orge, on constate que les petites structures survivent mieux sur un milieu frais - KAO 1981 (479). Cependant, le milieu de régénération a une influence limitée, puisque, lorsque les embryons sont de bonne qualité, ils régénèrent dans des conditions très diverses (20 à 28°C, lumière ou obscurité, milieux gélosés très divers). Aussi, il nous semble que l'amélioration substantielle du taux de régénération ne dépend que pour une très faible part de travaux effectués sur les milieux gélosés de culture des embryons. Plus importants semblent être l'effet du volume gazeux et de la composition de l'atmosphère contenus dans les boîtes.

b) Influence de la qualité et de l'âge des embryons : L'observation, à la loupe binoculaire permet de classer les embryons en deux catégories : la première est constituée d'embryons lisses sans ébauches méristématiques visibles, la seconde est celle des embryons présentant un scutellum et un méristème caulinaire (Figures 12 et 13). Ce dernier type d'embryon régénère plus fréquemment (Tableau 18) et permet d'obtenir près de 5 fois plus de plantes chlorophylliennes - DE BUYSER et HENRY 1979 (210). En ce qui concerne les plantes albina, la variation des taux de régénération est beaucoup plus faible. La qualité des embryons détermine également le type de régénération puisque les embryons les mieux structurés fournissent moins de plantes albina.

Les deux catégories observées ne correspondent pas à des différences dans le stade de développement, et il n'est pas actuel-

Tableau 15 : Taux de régénération en fonction du milieu.
Comparaison de milieux gélosés :

Année	1979		1982		1982	
Milieux	RP	R8	RDA	RP	RDA	RDA puis RP
Nombre d'embryons	1635	2383	145	162	254	190
Nombre de plantes chlorophylliennes régénérées	155	160	21	19	22	17
Taux de régénération (%)	9,4	6,7	14,5	11,7	8,7	8,9
	a	b	d	d	e	e

a,b - d,e : significativement différents au seuil 5 %

Tableau 16 : Taux de régénération en fonction du milieu.
Comparaison de milieux gélosé ou liquide :

Milieu	RG gélifié	RG liquide
Nombre d'embryons	1023	1148
Nombre de plantes chlorophylliennes régénérées	65	74
Taux de régénération (%)	6,35	6,44

Tableau 17 : Taux de régénération : comparaison entre tubes plastiques et boîtes de Pétri.

Milieu	RDA tube	RDA boîte
Nombre d'embryons	283	379
Nombre de plantes chlorophylliennes régénérées	9	45
Taux de régénération (%)	3,2	11,9
	a	b

a,b : significativement différents au seuil 5%.

a b c

Figure 12 : Embryons et cal obtenu par culture d'anthères
a : embryon avec scutellum
b : embryon lisse
c : cal

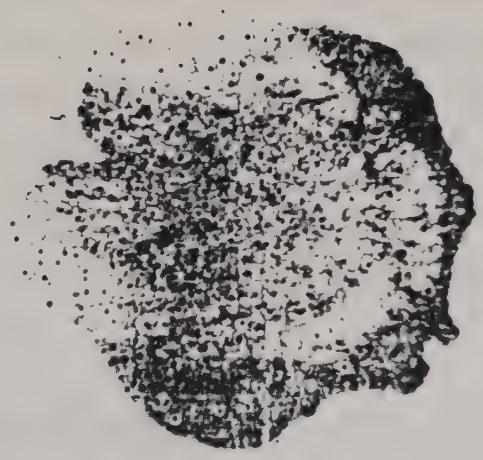


Figure 13 : Embryon vu en coupe.

lement possible de déterminer quels embryons fourniront les plantes albina et les plantes chlorophylliennes.

Le taux de régénération varie également en fonction de l'âge des embryons (Figure 14), plus ceux-ci sont repiqués tardivement et plus la régénération est faible - TSAY et LIN 1976 (1004), DE BUYSER et HENRY 1979 (210), TSAY et coll 1981 (1007). 90% des embryons sont repiqués avant 40 jours et fournissent 97% des plantes chlorophylliennes.

Le transfert dans le milieu de régénération RZ1 d'anthères cultivées deux semaines sur milieu solide, permet d'augmenter le taux de régénération, qui atteint 12,3%. Lorsque nous avons extrait les jeunes embryons de ces anthères, pour les transférer dans ce même milieu, aucune plante n'a été obtenue - HENRY et DE BUYSER 1981 (397). De même si le transfert des anthères est réalisé après seulement une semaine de culture, aucun embryon n'est produit.

Pour le Blé, le Riz et l'Orge, seules certaines structures régénèrent - WANG et coll 1973 (1054), PICARD&DE BUYSER 1975 (747), ASSELIN 1980 (49), KAO 1981 (479). Pour notre part, nous observons que les embryons régénèrent d'autant plus fréquemment qu'ils possèdent une structure embryonnaire normale. La qualité des embryons est déterminée durant l'embryogenèse et semble meilleure sur certains milieux contenant de l'extrait de pomme de terre (Figure 5).

L'étude des effets du milieu de culture des anthères et du repiquage - HENRY DE BUYSER 1981 (397)-, sur la qualité des embryons devrait permettre d'améliorer le taux de régénération. Un passage plus progressif d'un milieu riche en sucre et en 2,4-D, à un milieu plus pauvre en saccharose, et sans 2,4-D devrait être plus favorable. Il apparait enfin que les embryons sortent en deux vagues successives. L'apparition trop précoce ou trop tardive n'est guère favorable à la régénération par suite d'une moins bonne qualité des embryons.

c) Influence du contexte génétique : Lorsque nous observons le taux moyen de régénération en plantes chlorophylliennes en fonction de la génération de sélection (Tableau 19), les origines génétiques F_1 présentent le plus faible taux : 2,8%. Par contre les lignées avancées sont meilleures. En ce qui concerne le nombre de plantes

Tableau 18 : Taux de régénération en fonction de la qualité des embryons.

Types d'embryons	Sans ébauche méristématique caulinaire	Avec ébauche méristématique caulinaire
Nombre d'embryons repiqués	6072	1101
Nombre de plantes régénérées	417	316
Taux de régénération (%)	6,9	28,7
Nombre de plantes albina / Nombre de plantes chlorophylliennes (%)	33	16

Figure 14 : Taux de régénération en fonction de l'âge des embryons lors du repiquage.

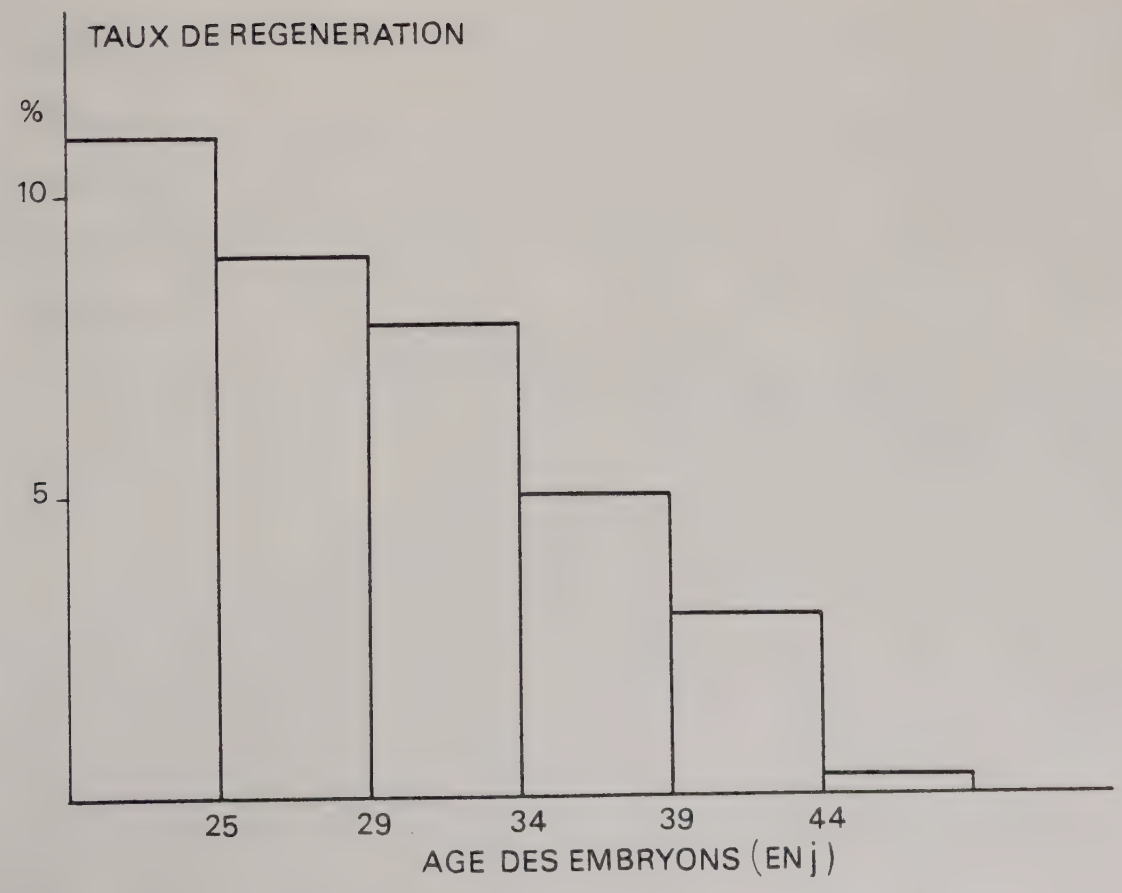


Tableau 19 : Taux de régénération des plantes chlorophylliennes en fonction de la génération de sélection

Génération de sélection	F_1	F_2-F_3-F_4-BC_1	F_5-F_6-F_7
Nombre d'origines testées	11	35	24
Taux de régénération en plantes chlorophylliennes (pour 100 embryons)	2,8 a	6,6 b	7,3 b
Nombre de plantes chlorophylliennes pour 1000 anthères cultivées	0,45	1,10	0,94

a,b : significativement différents au seuil 5 %.

Tableau 20 : Corrélation entre le taux d'embryons et le taux de régénération.

Nombre d'embryons pour 100 anthères / Nombre de plantes chloro-phylliennes pour 100 embryons	0 à 1,09	1,1 à 2,03	2,04 à 6	plus de 6
0 à 3,5	13	7	15	3
3,6 à 6	11	5	5	0
6,1 à 10	12	6	3	0
plus de 10	7	4	1	5

Tableau 21 : Taux de régénération lorsque les taux d'embryons sont identiques :

Parent commun	femelle		mâle et femelle	
Génération de sélection	F_1		F_7	
Origines génétiques	D_1	D_2	772	773
Pourcentage d'anthère embryogènes (%)	1,08	1,08	0,53	0,53
Taux de régénération (%)	12,0 a	2,7 b	1,7 b	8,9 ac

a,b,c : significativement différents au seuil 5 %.

Tableau 22 : Taux de régénération de 6 lignées soeurs :

Origine et	F_5	1er groupe		2ème groupe			
séparation des	F_7			1er sous-groupe		2ème sous-groupe	
lignées soeurs	F_8	B_{11}	B_{12}	B_{13}	B_{14}	B_{15}	B_{16}
Pourcentage d'anthères embryogènes (%)		1,9	1,1	7,9	6,4	22,9	17,6
Taux de régénération des plantes chlorophylliennes (%)		0 a	6,9 a	30,4 d	15,3 b	15,6 b	21,8 c
Nombre de plantes chlorophylliennes par épi cultivé		0	0,04	1,4	0,6	2,1	2,3

a,b,c,d, : significativement différents au seuil 5 %.

Tableau 23 : Taux de régénération en fonction du nombre chromosomique :

Génotype	Atys		200		hybride Blé tétraploïde par Blé tendre
Nombre chromosomique des plantes mères	42 (6x)	21 (3x)	42 (6x)	21 (3x)	35 (5x)
Nombre d'embryons pour 100 anthères	1,7	0,8	1,8	0,6	5,8
Nombre de plantes chlorophylliennes pour 100 embryons	56,1	23,5	24,9	6,6	1,5

Tableau 24 : Taux de régénération des plantes albina en fonction de la génération de sélection :

Génération de sélection	F_1	F_2-F_3-F_4-BC_1	F_5-F_6-F_7
Nombre d'origines génétiques testées	11	35	24
Pourcentage d'albina parmi les plantes régénérées	40%	16%	15%
Nombre de plantes albina pour 1000 anthères cultivées	0,31	0,24	0,16

chlorophylliennes obtenus pour 1000 anthères cultivées, ce sont les niveaux intermédiaires F_2-F_3-F_4-BC_1 qui se révèlent les plus intéressants.

En effet, le nombre de plantes chlorophylliennes dépend du taux d'embryons, mais aussi du taux de régénération. Ce ne sont pas les origines produisant le plus d'embryons qui régénèrent le plus grand nombre de plantes vertes, puisque les deux facteurs ne sont

pas liés (Tableau 20). Le coefficient de corrélation entre taux d'embryons et taux de régénération r = 0,22 n'est pas significativement différent de 0 au seuil de 1%. Pour les F_1, il pourrait cependant exister un coefficient négatif, bien que nous ne disposions que de 11 informations.

Certaines origines testées en androgenèse possèdent un parent commun. Dans ce cas, lorsque les taux d'embryons sont identiques (Tableau 21), nous pouvons observer des taux de régénération très différents, indiquant une influence de l'autre parent dans le cas des F_1, ou d'une sélection différente pour les F_7. Un autre exemple concerne l'analyse que nous avons pu réaliser à partir de 6 lignées soeurs provenant d'un même croisement, et séparées à différentes générations de sélection (Tableau 22). Pour les lignées séparées en F_8, les taux d'embryons sont relativement proches, cependant les taux de régénération peuvent être très différents. Nous passons de 0% de régénération à 30%. Ces résultats confirment l'absence de corrélation entre taux d'embryons et taux de régénération, et montrent que ces deux facteurs peuvent être sélectionnés de manière indépendante. Nous pouvons également noter l'extrême variabilité de réponse en androgenèse obtenuepour ce croisement, puisqu'une lignée ne fournit aucune plante verte alors que sa lignée soeur peut en donner plus de 2 par épi cultivé.

L'absence de relation entre le taux d'embryons et le taux de régénération indique que le déterminisme des deux phénomènes est différent, comme cela a été également montré chez le Pétunia - RAQUIN 1982 (787) - et le Riz - TSAY et coll 1982 (1003). Il sera donc possible d'optimiser ces deux facteurs indépendamment.

Le développement des embryons en plantules est fonction du génotype du matériel de départ - RAQUIN 1982 (787) - qui détermine la qualité moyenne des embryons. Le génotype de l'embryon n'est pas déterminant, puisque le taux de régénération des embryons provenant d'haploïdes doublés - qui ont déjà subi le crible de la culture in vitro - n'est pas supérieur, mais souvent même inférieur à celui de la lignée de départ - PICARD et DE BUYSER 1977 (749), RAQUIN 1982 (787).

Les plantes albina, rarissimes chez les Solanacées, sont très fréquentes chez les Graminées, où elles représentent presque 100% du matériel régénéré chez le Ray-grass - PAGNIEZ et DEMARLY

1979 (716) -, 90% chez l'Orge - FOROUGHI et coll 1976 (306) - et seulement 20 à 30% chez le Blé - DE BUYSER et HENRY 1979 (210). Des plantes non chlorophylliennes existent également chez le Seigle - WENZEL et coll 1974 (1074). Chez le Riz, les plantes albina possèdent les mêmes nombres chromosomiques que les plantes vertes, avec cependant assez souvent la présence de micro-noyaux - ZHU et coll 1978 (1146). Chez le Riz également, une diminution de la fréquence des albina est associée à une augmentation de la consanguinité - OONO 1975 (709), TSAY et LIN 1976 (1004), VIN et coll 1976 (1117), WOO et HUANG 1982 (1104).

La signification de ces données est claire, une partie importante des plantes albina régénérées sont d'origine génétique. Les autres causes d'albinisme peuvent être :

- des mutations ponctuelles. La présence de différents phénotypes non chlorophylliens en culture d'anthères, peut correspondre aux nombreux gènes qui interviennent dans le déterminisme de ce caractère.
- des anomalies physiologiques.

Parmi les facteurs susceptibles de modifier la fréquence des plantes albina, il faut citer : les milieux de culture - MIX et coll 1976 (598), CHUANG et coll 1978 (171), DE BUYSER et HENRY 1980 (213), WEI 1982 TAG -, les conditions de culture des anthères, en particulier les températures élevées - WANG CC et coll 1977 (1058) -, et la qualité des embryons, puisque chez le Blé les embryons sans ébauches présentent un taux de régénération en plantes albina plus élevé (Tableau 18).

Le fait que, chez le Blé, près de la moitié des plantes polliniques albina puissent être d'origine génétique, alors qu'elles sont rares en autofécondation, semble confirmer qu'il existe pour ce caractère, un taux de sélection différent en androgenèse de celui qui existe en autofécondation. Une telle hypothèse est compatible avec les données concernant les anomalies chromosomiques chez le Tabac - MATTINGLY et COLLINS 1974 (571), pour lequel il est possible d'obtenir en culture d'anthères de monosomiques, des nullihaploïdes (et des nullisomiques) que l'on n'observe pas en autofécondation de ces mêmes monosomiques - MOORE et COLLINS 1982 (610).

La régénération apparaît comme étant l'un des facteurs limitants dans l'androgenèse du Blé tendre alors que, là encore, les potentialités sont très importantes puisque nous avons pu régénérer 9 plantes chlorophylliennes à partir d'une seule anthère (0,5% des microspores). Le principal facteur de réussite à ce niveau, est la qualité des embryons, qualité qui paraît être déterminée au cours de la phase de culture des anthères, et sur laquelle l'influence du génotype de la plante mère s'exerce.

III. NIVEAUX DE PLOIDIE ET OBTENTION DES SEMENCES : Les plantes d'origine pollinique obtenues par culture d'anthères présentent des niveaux de ploïdie variés. Si, dans le cas du Tabac, la grande majorité des plantes sont haploïdes - BURK et coll 1972 (118) -, chez le Petunia 90% sont triploïdes - RAQUIN et PILET 1972 (780). D'autres espèces comme le Riz - HU HAN 1978 (431) -, le Datura - ENGVILD et coll 1972 (293) -, Nicotiana sylvestris - MC COMB et MC COMB 1977 (552) - et le Colza - WENZEL et coll 1977 (1078) - produisent des individus haploïdes, diploïdes, triploïdes, tétraploïdes, voire quelques hexaploïdes. Selon les conditions de culture, la fréquence des haploïdes varie. Ainsi, chez le Datura innoxia, la culture des microspores fournit presque exclusivement des plantes haploïdes - SUNDERLAND 1978 (951). Enfin, quelques espèces comme l'Orge - MIX et coll 1978 (601) -, la pomme de terre - WENZEL 1980 (1085) -, le Seigle - HOFFMANN et WENZEL 1981 (418) - et le Maïs - TING et coll 1980 (993) - fournissent essentiellement des plantes haploïdes et diploïdes, et quelques rares tétraploïdes. Le Blé appartient à ce dernier groupe.

a) Détermination du niveau de ploïdie : Un dénombrement chromosomique rapide permet de classer les plantes régénérées en deux groupes de niveaux de ploïdie différents :
- haploïdes. Un traitement par la colchicine est nécessaire pour restaurer la fertilité.
- diploïdes, ne nécessitant aucun traitement.

Cette observation cytologique ne permet pas de mettre systématiquement en évidence les anomalies chromosomiques numériques. Le tableau 25 indique le niveau de ploïdie des plantes obtenues.

66,6% des individus possèdent le niveau haploïde (Figure 15), cependant près de 33% sont diploïdes spontanés (Figure 16). Nous avons également observé quelques plantes tétraploïdes (0,5%).

b) Origine des diploïdes spontanés : Chaque année, nous observons une forte proportion de plantes d'origine pollinique de niveau diploïde (Tableau 26). Cette proportion est variable selon les années. Dans la mesure où les milieux de culture et les génotypes varient chaque année, nous avons recherché si ces deux facteurs avaient une influence sur le taux de plantes diploïdes obtenues. Selon le milieu de culture des anthères qui est utilisé (Tableau 27), et parfois selon l'origine génétique testée (Tableau 28), les fréquences de plantes haploïdes et diploïdes varient.

Par contre, nous observons (Tableaux 29-30-31-32) que la période de l'année, la génération de sélection, la qualité des embryons et le milieu de régénération sont sans influence sur le niveau de ploïdie des plantes chlorophylliennes régénérées. De même, les plantes albina présentent un taux de diploïdes identique à celui des plantes chlorophylliennes (Tableau 33).

Les données concernant les couples de plantes provenant d'une même anthère (Tableau 34) confirment la relative homogénéité des microspores contenues dans une anthère.

Les travaux entrepris en collaboration avec AMSSA - AMSSA et coll 1980 (12) - ont montré que l'action combinée du prétraitement au froid et de la culture in vitro détermine le taux de diploïdes spontanés.

Il n'existe pas, en culture d'anthères de Blé tendre, de développement des tissus somatiques des parois de l'anthère, phénomène que l'on observe rarement chez le Riz - WU et KIANG 1979 (1106). Par ailleurs, la non réduction des cellules mères du pollen est très rare chez le Blé tendre - AMSSA et coll 1980 (12) - contrairement à ce qui a pu être observé chez le Seigle - WENZEL et coll 1976 (1077) - et la Pomme de terre - WENZEL et coll 1982 (1089) - ou plus rarement chez le Pétunia - RAQUIN 1982 (786) - et le Maïs - BRETTEL et coll 1981 (112). Cette anomalie de méïose ne peut donc être à l'origine des diploïdes spontanés que nous obtenons chez le Blé. Ceci est conforme aux observations réalisées en champ : il n'existe pas de larges ségrégations dans les descendances des Blés

Figure 15 : Métaphase haploïde (n = 21 chromosomes).

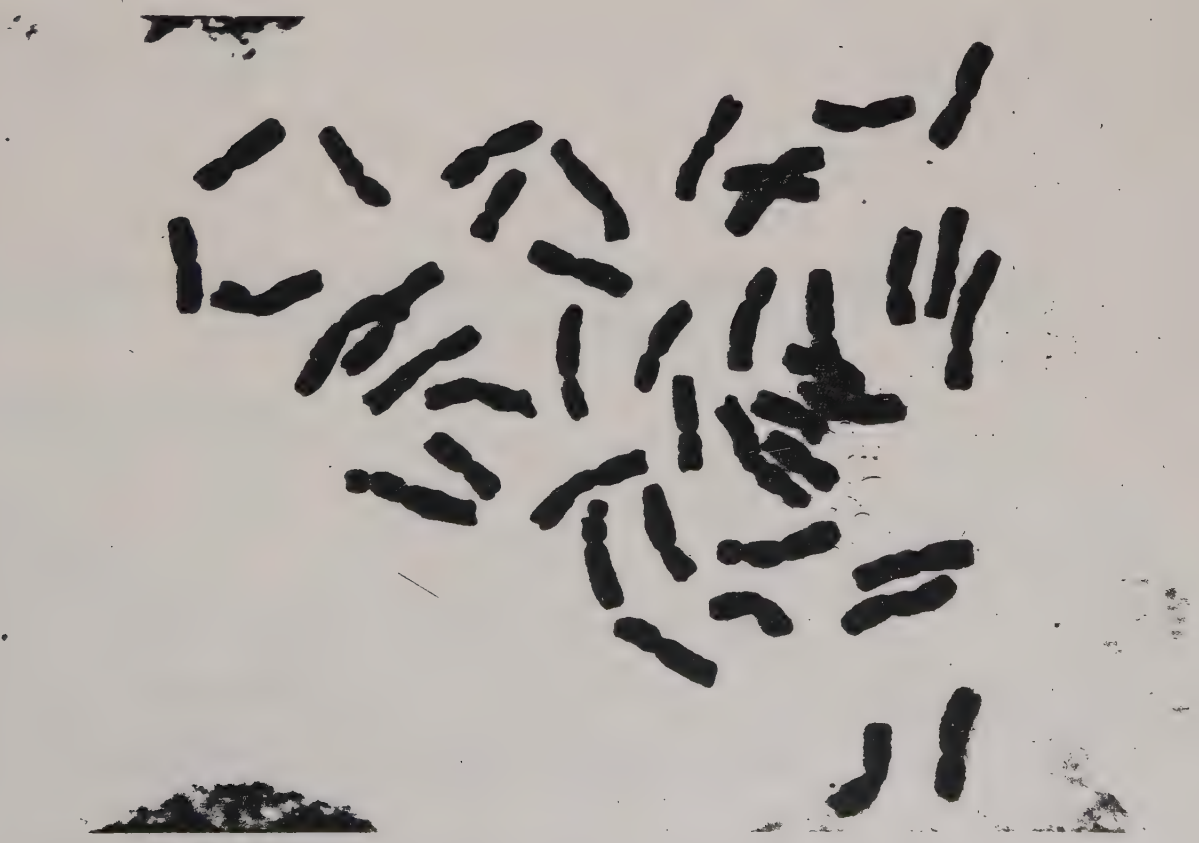


Figure 16 : Métaphase diploïde (2n = 42 chromosomes).

Tableau 25 : Niveaux de ploïdie des Blés obtenus par culture d'anthères :

Ploïdie	4n = 12x = 8	2n = 6x = 42	n = 3x = 21
Effectif observé	9	592	1199
%	0,5	32,9	66,6

Tableau 26 : Taux de diploïdes spontanés annuels.

Année	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982
Nombre de plantes chlorophylliennes régénérées	91	286	105	315	540	328	361
Pourcentage de diploïdes spontanés parmi les plantes survivantes	46%	44%	35%	27%	38%	25%	28%
Milieux de culture les plus utilisés	B	B	$B\text{-}B_4$	P	$P\text{-}G_2$	PG_3	PG_3

Tableau 27 : Taux de plantes diploïdes observé en fonction du milieu de culture des anthères.

Milieu de culture		B_4	B	P	
Niveaux de ploïdie					
Effectifs observés	haploïde	80	100	201	
	diploïde	38	85	77	$X_2^2 = 16,66$ HS
Taux de diploïdes		32%	42%	28%	

Tableau 28 : Taux de plantes diploïdes en fonction de l'origine génétique.

Origine		D_1	409	
Niveau de ploïdie				
Effectifs observés	haploïdes	54	38	
	diploïdes	9	17	$X_1^2 = 4,75$ S
Taux de diploïdes		14,3%	30,9%	

Tableau 29 : Taux de plantes diploïdes en fonction du mois.

Mois		Avril	Mai	Juin	
Niveau de ploïdie					
Effectifs observés	haploïde	63	90	54	$X_2^2 = 2,41$ NS
	diploïde	27	36	13	
Taux de diploïdes		30%	28,6%	19,4%	

Tableau 30 : Taux de plantes diploïdes en fonction de la génération de sélection.

Génération de sélection		F_1	F_2 à F_4	F_5 à F_7	
Niveau de ploïdie					
Effectifs observés	haploïde	141	387	228	
	diploïde	70	230	136	$X_2^2 = 1,71$ NS
Taux de diploïdes		33,2%	37,3%	37,4%	

Tableau 31 : Taux de plantes diploïdes en fonction de la qualité des embryons.

Qualité des embryons / Niveau de ploïdie		avec ébauches méristématiques	sans ébauches	
Effectifs observés	haploïde	82	120	
	diploïde	27	49	$X_1^2 = 0,59$ NS
Taux de diploïdes		24,8%	29,-%	

Tableau 32 : Taux de plantes diploïdes en fonction du milieu de régénération

Milieu / Niveau de ploïdie		RG	RZ_2	RZ	
Effectifs observés	haploïde	88	36	172	
	diploïde	58	28	108	$X_2^2 = 0,64$ NS
Taux de diploïdes		39,7%	43,8%	38,5%	

diploïdes spontanés obtenus par culture d'anthères d'hybrides F_1 - OYANG et coll 1973 (714), DE BUYSER et PICARD 1975 (208), HU et coll 1978 (430), HENRY et DE BUYSER 1980 (396)-.

Il a été possible de mettre en évidence, chez le Blé, plusieurs faits concernant le moment où se produit le doublement, et les facteurs qui le permettent :

- En premier lieu, nous avons confirmé l'hypothèse selon laquelle le doublement est un phénomène précoce - MAC COMB et MAC COMB 1977 (552), PEARSON et NILAN 1975 (729)-. Ainsi, alors qu'il n'existe

pas de microspores diploïdes lors du prélèvement des épis, l'observation de la première mitose en culture révèle 8% de métaphases diploïdes - AMSSA et coll 1980 (12)-. Ce pourcentage se retrouve inchangé au niveau des embryons, en l'absence de prétraitement au froid, et est très voisin de celui déterminé pour les plantes régénérées dans ces conditions - SCHAEFFER et coll 1979 (838).

Lorsque le choc thermique précède la mise en culture, le pourcentage de diploïdes spontanés est voisin de 25% pour la première mitose des microspores, les embryons à leur sortie de l'anthère et les plantes régénérées - AMSSA et coll 1980 (12)-.

Ces résultats indiquent que les plantes diploïdes proviennent des microspores qui se sont doublées spontanément dès le début de la culture. Ce doublement se produit durant la phase de latence qui précède la première division embryonnaire. L'observation chez le Blé, lors des rares métaphases synchrones (4%), d'exceptionnelles métaphases diploïdes du noyau de la cellule végétative, alors que le noyau de la cellule reproductrice est demeurée haploïde, indique la possibilité d'éventuels doublements entre la première et la seconde division embryonnaire. L'homogénéité du nombre chromosomique de chaque embryon et de chaque plante révèle la rareté des variations du niveau de ploïdie durant le développement des embryons et la régénération des plantes.

Tableau 33 : Taux de diploïdes parmi les plantes albina et chlorophylliennes.

Plantes / Niveau de ploïdie		Albina	Chlorophylliennes	
Effectifs observés	haploïde	31	104	
	diploïde	14	52	$X_1^2 = 0,06$ NS
Taux de diploïdes		31,1%	33,3%	

Tableau 34 : Niveaux de ploïdie des couples de plantes obtenues à partir d'une même anthère.

Niveaux de ploïdie	n-n	2n-n	2n-n
Nombre d'anthères observées	27	14	10

$X_1^2 = 7,57$ S

- En second lieu, l'analyse des métaphases de la première mitose des microspores uninucléées,démontre que deux facteurs : le prétraitement au froid des épis, et la culture in vitro des anthères entraînent les doublements. La culture seule fournit 8% de diploïdes mais l'action successive du froid et de la culture permet d'en obtenir 27%. Les milieux de culture à base d'extrait de pomme de terre (Tableau 27) induisent moins de doublements que le milieu synthétique B, du fait que le démarrage de l'embryogenèse y est plus rapide que sur B - DE BUYSER et HENRY 1980 (213)-. Plus le démarrage est rapide, plus le taux d'haploïdes est élevé, et plus le nombre de plantes obtenues augmente - KELLER et ARMSTRONG 1978, 1979 (495,498)-.

Le prétraitement au froid des épis (3°C) présente une action à deux niveaux :

. il permet d'observer 3% de métaphases diploïdes avant la mise en culture. Ceci est en accord avec les données concernant l'action des chocs thermiques sur le niveau de ploïdie des cultures de tissus - JENSEN 1974 (468)-. Par ailleurs, la cytospectrophotométrie montre que 5% des microspores, toutes uninucléées, ont à la sortie du froid une quantité d'ADN supérieure à 2C - RAQUIN et coll 1982 (788)-. Préalablement à la culture, le froid a provoqué des endoreduplications.

. lorsque nous faisons agir le froid, puis la mise en culture, le pourcentage de première mitose diploïde atteint 27% -contre 8% en l'absence de froid. En outre, après ce traitement au froid et 3 ou 5 jours de culture, respectivement 35% et 60% des microspores demeurées uninucléées, ont une quantité d'ADN supérieure à 2C -RAQUIN et coll 1982 (788)-. Ceci confirme la réalité des endoreduplications qui se produisent avant la première division des microspores uni-

nucléées. Un tel évènement semble exister chez le Pétunia - RAQUIN et coll 1982 (788)-. Tout se passe, chez le Blé, comme si le froid avait rendu une fraction des noyaux aptes à se doubler ultérieurement, durant les premiers jours de culture, où ils passent de 2C vers 4C - RAQUIN et coll 1982 (788)-.

Chez certaines espèces comme le Datura, le noyau végétatif révèle une tendance naturelle à l'endoreduplication in situ -SANGWAN-NORREELL 1979 (833)-. Contrairement à l'Orge - BOUHARMONT 1977 (106)- la rareté des métaphases synchrones (4%) observées chez le Blé - RAQUIN et coll 1982 (788) - confirme que les fusions métaphasiques ne peuvent expliquer le taux de diploïdes spontanés observé..

Nos résultats amènent à penser qu'une seule hypothèse peut expliquer chez le Blé, l'origine des plantes diploïdes spontanées : l'endoreduplication. Un noyau en G2 recommence une nouvelle synthèse au lieu de poursuivre son cycle mitotique normal par une division. Le doublement du stock chromosomique se produit dès les premiers stades du développement embryonnaire. Ce phénomène est stimulé par le stockage à 3°C des épis, et amplifié par la culture in vitro des anthères. Notons qu'endomitose et endoreduplication sont "utilisées" en culture in vitro de tissus végétaux pour induire le doublement du stock chromosomique - NITSCH&NITSCH 1970 (665)-.

c) Traitement des plantes haploïdes par la colchicine : La comparaison de l'efficacité des deux techniques de doublement est indiquée dans le tableau 35. Le traitement en serre (traitement 2) donne un pourcentage de réussite double du traitement en tube (traitement 1). Il importait alors de savoir si cette différence provenait d'un plus grand nombre de talles traitées, ou d'un meilleur rendement du doublement. Nous avons, à cet effet, analysé les résultats obtenus au niveau des talles (Tableau 36). Il apparaît que le rendement du doublement dépend du mode d'application de la colchicine.

Après le traitement en tube, près de 57% des talles traitées meurent, contre seulement 39% dans le traitement en serre. Le nombre de talles traitées par plante est en moyenne de l'ordre de 6,4 en tube et de 10,5 en serre. Le meilleur rendement du doublement des haploïdes en serre résulte donc de la meilleure efficacité de cette seconde technique : 32,2% de talles doublées en serre contre

14,6% en tube. En outre, le plus grand nombre de talles traitées en serre améliore sensiblement le taux de réussite. Nous observons donc, selon que le traitement a lieu en tube ou en serre, respectivement 2,3 ou 4,0 talles fertiles par plante doublé. Remarquons le fait que les talles doublées apparaissent plus tard que les talles demeurées haploïdes (Tableau 3).

Cependant, lorsque le nombre d'haploïdes obtenus sera suffisamment élevé, nous pensons qu'il sera nécessaire d'utiliser une technique plus simple, telle que celle pratiquée sur l'Orge, par trempage de la plante au stade trois talles, dans la solution de colchicine.

Tableau 35 : Taux de doublement des plantes haploïdes en fonction de la technique.

	Tube Traitement 1	Serre Traitement 2	
Nombre de plantes traitées	88	280	
Nombre de plantes doublées	36	235	
%	40,9	83,9	$X_1^2 = 31,2$ HS

Tableau 36 : Taux de doublement des talles haploïdes :

	Tube Traitement 1	Serre Traitement 2	
Nombre de talles traitées	567	2960	
Nombre de talles survivantes	242	1812	
%	42,7	61,2	
Nombre de talles doublées	83	953	
%	14,8	32,2	$X_1^2 = 69,8$ HS

Tableau 37 : Fertilité des plantes obtenues par culture d'anthères en fonction du niveau de ploïdie :

Niveaux de ploïdie		4 n	2 n	n
Effectif observé		9	458	835
	%	0,7	35,1	64,1
Nombre de plantes	fertiles	0	352	561+
	peu fertiles	1	71	77+
	stériles	8	35	188+

+ : après traitement par la colchicine

d) Fertilité des haploïdes doublés et de leur descendance : La fertilité du matériel haploïde doublé a été notée en fonction du niveau de ploïdie (Tableau 37).

Parmi les 458 diploïdes spontanés cultivés en serre, seuls 352 présentaient une bonne fertilité. Les épis les plus fertiles possédaient, dans nos conditions de serre, jusqu'à plus de 100 grains. Par contre, 35 plantes se sont révélées totalement stériles et 71 n'ont donné que très peu de grains (1 à 20).

561 plantes haploïdes ont fourni après traitement au moins un épi fertile. Les épis les plus garnis possédaient jusqu'à 77 grains. 188 plantes sont demeurées stériles et 77 n'ont donné qu'un nombre limité de grains (1 à 10) (Figure 17).

9 plantes présentaient un nombre chromosomique de 4n=12x=84 chromosomes, en l'absence de tout traitement. Parmi ces plantes, 8 se sont révélées totalement stériles, même lors des tentatives de pollinisation manuelle. Seule, une plante a fourni quelques grains.

Les faibles fertilités et la stérilité observées chez quelques haploïdes doublés spontanés peuvent avoir des origines diverses : anomalies chromosomiques, erreur de comptage et absence de gènes de restauration. En effet, une origine testée possède le cytoplasme qui induit la stérilité mâle (Triticum timopheevi). Il est possible de régénérer des plantes chlorophylliennes ayant ce cyto-

plasme - PICARD et DE BUYSER 1973 (743)-. Dans nos expériences, seules les plantes possédant les gènes de restauration sont fertiles.

En ce qui concerne les haploïdes traités par la colchicine, outre les causes décrites précédemment, la plupart du temps la stérilité est imputable à l'échec total ou partiel du traitement diploïdisant. En effet, il n'est pas rare d'observer le doublement d'un secteur de l'épi qui produit peu de grains. Dans la plupart des cas, ces doublements sectoriels sont accompagnés d'anomalies chromosomiques numériques (40-41 chromosomes).

Ces anomalies chromosomiques peuvent préexister. Il est possible de régénérer des plantes aneuhaploïdes (n = 20,22,21+télosome) qui après traitement par la colchicine demeurent stériles ou partiellement fertiles.

Il faut enfin signaler que les plantes haploïdes sont femelles fertiles. Nous avons observé la présence de grains sur plusieurs haploïdes répartis autour de deux individus diploïdes. L'étude de la descendance a confirmé la nature hybride des grains récoltés sur les plantes haploïdes. Il est d'ailleurs intéressant de noter que c'est à partir de croisements entre plantes haploïdes femelles et diploïdes que SEARS 1939 et 1954 (852-853)- a débuté tous les travaux qui ont conduit à la création des séries aneuploïdes de Blé.

Lors des observations en champ, nous avons trouvé des descendances hétérogènes aussi bien parmi les haploïdes doublés à la colchicine (32 sur 172) que chez les diploïdes spontanés (26 sur 90). Aussi nous avons tenté de relier la présence d'hétérogénéité dans une descendance, à la fertilité de la plante récoltée en serre lors de la première génération. Nous constatons que les HD traités à la colchicine produisant une descendance en ségrégation, possédaient en moyenne 10 grains sur leur épi le plus fertile, contre 42,4 pour ceux dont la descendance est normale. Les valeurs équivalentes pour les diploïdes spontanés sont respectivement 19,1 et 37,6. Les valeurs moyennes des HD stables correspondent aux valeurs moyennes de variétés observées en condition de serre (Tableau 39). Ainsi, moins l'épi récolté en serre est fertile, plus le risque de descendance en ségrégation est élevé. Par exemple, au seuil de

20 grains, 20% des HD sont en ségrégation et à moins de 5 grains, pratiquement toutes les descendances sont hétérogènes (Figure 18).

La présence d'une hétérogénéité au sein d'une descendance peut souvent être rattachée à des anomalies chromosomiques. En 1981, nous avons observé que les aneuploïdes issus d'androgenèse avaient en serre des fertilités très faibles et donnaient des descendances hétérogènes. Ainsi, la fertilité des épis récoltés sur les HD aussi bien spontanés qu'après traitement à la colchicine, est un bon indicateur de la stabilité chromosomique. Le fait qu'il existe plus d'anomalies ches les diploïdes spontanés que chez les haploïdes doublés peut s'expliquer par la meilleure viabilité des embryons et des plantes aneuploïdes que de ceux aneuhaploïdes.

D'un point de vue pratique, il est utile soit d'éliminer les plantes peu fertiles en serre, soit de les suivre avec une attention toute particulière, avec l'espoir de retrouver un niveau chromosomique stable dans la descendance.

De même, une étude plus approfondie est nécessaire pour vérifier si les instabilités observées chez quelques plantes à 42 chromosomes ne résultent pas de la constitution génétique de ces plantes : en effet, il n'est pas rare de trouver en sélection classique certaines lignées ou variétés dites infixables malgré un nombre important d'autofécondations.

e) Anomalies chromosomiques : L'observation des lignées HD dans les conditions naturelles de culture a permis de déceler quelques anomalies au niveau des descendances en autofécondation. Hormi les mélanges accidentels d'épis, nous avons pu observer :
- la présence d'une plante mutante parmi une descendance homogène,
- la présence d'une descendance hétérogène (Figure 19).

Le premier cas est fréquent en sélection, et il n'est pas rare de voir dans les variétés classiques les mêmes types de mutants que ceux que nous observons : plantes speltoïdes, compactoïdes, effilées, vert lâche ou barbues. Ces types correspondent à des mutations connues. De plus, il ne semble pas que ces mutations soient plus fréquentes chez les lignées HD que dans les variétés classiques - DEATON et coll 1982 (205)-. Le second point a retenu notre attention et nous a conduit à effectuer des dénombrements chromosomiques précis sur quelques HD ou descendances d'HD.

Figure 17 : Types d'épis observés après traitement par la colchicine. De gauche à droite : épi haploïde stérile, 2 épis fertiles, 2 épis partiellement fertiles (doublements sectoriels).

En 1980, il nous a été possible d'effectuer des comptages précis sur un certain nombre de plantes. Nous avons trouvé des anomalies chromosomiques aussi bien pour les haploïdes que pour les diploïdes spontanées:

- plantes à 20, 21+ télosome, 22 chromosomes;
- plantes à 40, 41 (Figure 20), 41+ télosome, 40+1 isochromosome (Figure 21), 43 (Figure 22) et 44 chromosomes;
- plantes à 84 chromosomes.

Une étude de la méïose de plantes choisies a été confiée à G. TALEB. Les observations confirment et précisent les dénombrements effectués sur pointes de racines, et ont permis de déceler une plante à 47 chromosomes (44 + 2 télosomes + 1 isochromosome). De plus, il a été montré que des plantes à 42 chromosomes pouvaient avoir un comportement méïotique irrégulier : présence d'un taux élevé de quadrivalents ou présence de 20 bivalents plus un hétérobivalent. Il existe donc des plantes à 42 chromosomes qui sont hétérozygotes de structure.

Figure 18 : Fertilité des plantes régénérées.

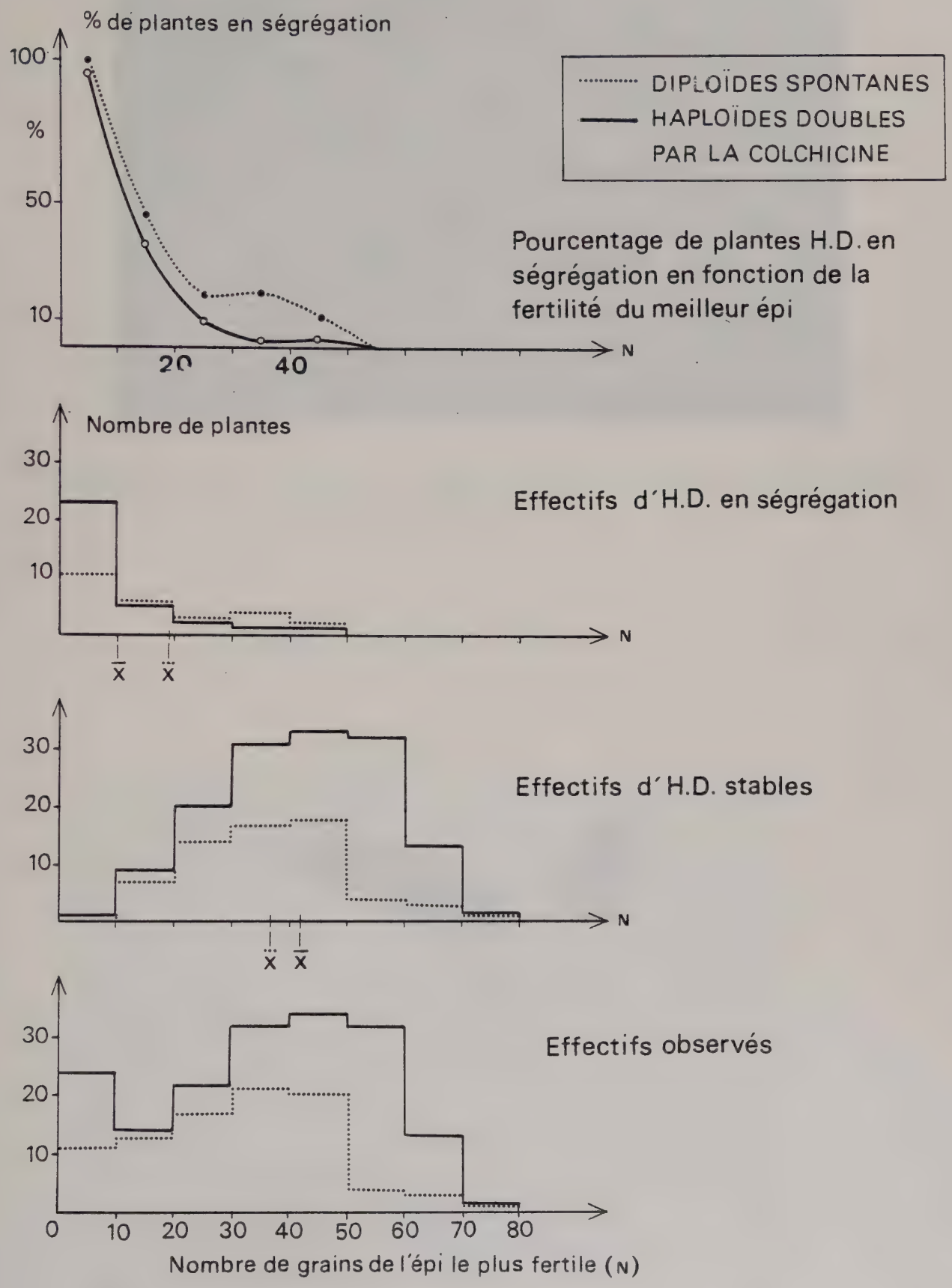


Figure 19 : Descendance en ségrégation d'un diploïde spontané d'origine pollinique.

Figure 20 : Univalent en méïose (2n = 41 chromosomes).

Figure 21 : Méïose à 2n = 40 + 1 isochromosome.

Figure 22 : Métaphase à 2n = 43 chromosomes.

Par ailleurs, nous avons entrepris l'analyse chromosomique de deux descendances d'HD spontanés présentant une forte hétérogénéité (plantes speltoïdes, aristées, courtes, glauques ou avec épis compacts). Nous avons mis en évidence la présence de plantes monosomiques (2n = 41) dans un cas et de plantes tétrasomiques dans l'autre (2n = 42 + 2 télosomes).

De même, l'étude (voir paragraphe f) d'un HD spontané de la variété Atys présentant une fertilité très réduite, confirme l'existence d'aneuploïdes obtenus par culture d'anthères.

Des anomalies chromosomiques de même type (mono, tri ou tétrasomique) ont pu également être observées chez des descendants issus d'haploïdes ayant subi un traitement à la colchicine (Figure 23).

b a

Figure 23 : Descendance d'un haploïde traité par la colchicine.
a) ligne de plantes courtes à 2n = 40 chromosomes;
b) ligne de plantes à 2n = 42.

Les auteurs chinois - HU et coll 1978 (429), ZHU et coll 1978 (1146), HU et HAO 1980 (437) - ont observé des anomalies chromosomiques sur des plantes régénérées par androgenèse chez le Blé tendre. Cependant, ces anomalies ne sont pas spécifiques à cette espèce, puisque par exemple chez l'Orge, des HD provenant d'androgenèse présentent des anomalies diverses : polyploïdie, mixoploïdie, anomalies structurales - FRIEDT et coll 1980 (317-318)-. C'est également le cas chez le Tabac - NIIZEKI 1976 (652) -, le Datura - NARAYANASWAMY et CHANDY 1971 (629) - , le Riz - OONO 1975 (709) - et plus généralement toutes les espèces où une analyse cytologique a pu être réalisée. Les anomalies chromosomiques sont relativement fréquentes en culture d'anthères, il est donc nécessaire d'en connaître l'origine.

Les anomalies chromosomiques éventuellement liées au traitement par la colchicine ne nous ont pas parues mériter d'attention particulière. Parmi les autres causes d'anomalies chromosomiques, deux méritent d'être étudiées : d'une part les anomalies peuvent être antérieures à la mise en culture des anthères, d'autre part elles peuvent se produire au cours de la culture in vitro.

Lors de la recherche du stade tétrade, nous avons pu observer que certaines F_1 présentaient un pourcentage élevé de chromosomes retardataires (Figure 24). En outre, AMSSA a montré par analyse spectrocytophotométrique que certaines tétrades possédaient des noyaux dont les quantités d'ADN étaient inférieures à 1C - RAQUIN et coll 1982 (788). La présence d'anomalies chromosomiques au niveau des microspores mises en culture peut dans certains cas expliquer l'origine des plantes androgénétiques anormales. Les plantes à 20, 22, 40 ou 44 chromosomes observées pourraient provenir de microspores à 20 ou 22 chromosomes. De telles anomalies de méïose sont connues chez le Datura - COLLINS et coll 1974 (183) - et le Tabac - COLLINS et SADASIVAIAH 1972 (178)-. De même, chez l'Orge et le Seigle des métaphases aneuploïdes existent dès la première division - SUN 1978 (918)-.

La culture in vitro peut également produire des anomalies chromosomiques. En culture in vitro de tissus somatiques d'Orge - ORTON 1980 (713)-, d'Avoine - MAC COY et coll 1982 (556) - , de Blé tendre - AHLOOWALIA 1982 (6) -, pour ne citer que des Grami-

Figure 24 : Chromosomes retardataires dans une cellule mère du pollen, au stade tétrade.

nées, la fréquence des anomalies chromosomiques est relativement élevée. Nous pouvons penser que de tels phénomènes existent en culture d'anthères : lors des mitoses embryonnaires, il se produirait des pertes de chromosomes entiers ou de fragments - BYLISS 1973 (1159) - , des remaniements chromosomiques (délétions ou translocations non réciproques) - GOULD 1982 (1185) - , des modifications plus fines du génome - DE PAEPE et coll 1982 (1175), CHOUREY et coll 1982 (1167)-. Ceci correspond assez bien à ce que l'on connaît de l'ADN des Eucaryotes, qui est une structure susceptible de nombreux réarrangements.

Il n'apparaît pas, chez le Blé tendre, que des modifications caryotypiques se produisent lors de la régénération des embryons. Cependant, chez d'autres espèces où l'androgenèse passe par une phase cal, il est probable que des anomalies chromosomiques peuvent apparaître lors de la phase de régénération - VASIL et coll 1979 (1030)-.

Divers facteurs peuvent influer sur la fréquence des aneuploïdes. Chez de nombreuses espèces, les cals polliniques et somatiques sont plus aneuploïdes en présence d'auxine et de cytokinine - NIIZEKI 1974 (648), OGURA 1982 (1215) - , facteurs qui augmentent aussi la polyploïdisation - NITSCH 1973 (1209)-. Les

milieux de culture peuvent ainsi modifier la fréquence de ces anomalies. Par ailleurs, plus la température de culture des anthères est élevée, plus la fréquence des plantes aneuploïdes régénérées augmente - OUYANG et coll 1980 (715)-.

f) Descendance aneuploïde d'un haploïde doublé spontané issu de la variété Atys : La variété Atys (blé de printemps), permet un bon rendement en androgenèse, et nous l'utilisons comme témoin lors de certaines comparaisons. L'un des premiers haploïdes doublés spontanés provenant de cette variété présentait une fertilité très réduite (un épi à 9 grains, un à 8 grains, un à 7 grains, un à 4 grains, un à 3 grains et 6 épis à 1 grain). La descendance de cette plante a été cultivée en serre en même temps que la variété témoin Atys.

La descendance de cet haploïde doublé montre une grande hétérogénéité pour les caractères étudiés. Deux plantes n'ont pas réussi à croître et sont demeurées végétatives et frêles. Neuf autres plantes ont une fertilité nulle.

L'analyse des mesures effectuées en conditions de serre (Tableau 38) montre que les moyennes des haploïdes doublés sont peu différentes de celles d'Atys, mise à part la fertilité (Tableau 39). Par contre, les étendues sont plus importantes chez les HD.

Des dénombrements chromosomiques ont été effectués sur les grains issus des plantes peu fertiles ou présentant des fertilités d'épis très variables. Ces analyses ont révélé la présence de plantes aneuploïdes (monosomiques et trisomiques). Les HD ont pu être classés en différents groupes selon le niveau de ploïdie de leur descendance.

Les plantes stériles ou très peu fertiles forment un groupe à part. Ces plantes ont des dimensions réduites pour tous les caractères étudiés (taille, longueur du dernier entre-noeud, longueur de l'épi).

Les plantes monosomiques correspondent à des plantes peu fertiles, le plus souvent courtes.

Les plantes trisomiques semblent plus normales, quoiqu'un peu plus grandes que le témoin Atys. Leur tallage est très élevé et leur fertilité n'est que très peu affectée.

Tableau 38 : Comparaison entre Atys et la descendance d'un haploïdedoublé issu de cette variété.

Matériel			descendance d'un haploïde doubé			
caractères morphologiques observés		Atys	ensemble	stériles ou peu fertiles	2n = 41	2n = 43	fertiles
hauteur des plantes (cm)	moyenne	52,2	53,0	37,1	45,4	64,9	55,9
	limites	38,2	25,5	25,5	38,1	63,9	53,0
		62,4	65,9	48,5	55,0	65,9	59,5
longueur du dernier entre-noeud (cm)	moyenne	23,4	23,5	15,5	22,1	29,4	24,2
	limites	16,2	8,6	8,6	16,8	27,4	22,2
		28,2	31,3	21,1	24,0	31,3	25,7
taille de l'épi (cm)	moyenne	6,8	7,8	5,5	6,8	8,4	8,7
	limites	5,8	4,1	4,1	6,2	7,8	8,2
		8,7	9,6	6,8	7,1	8,9	9,6
nombre d'épillets	moyenne	15,3	15,3	12,5	15,1	16,5	16,6
	limites	12,2	9,5	9,5	14,7	15,0	16,0
		18,7	17,5	15,0	16,4	18,0	17,5
fertilité (nombre de grains par épi, par plante)	moyenne	24,5	11,8	0,9	7,2	21,2	27,2
	limites	10,0	0	0	0,1	12,0	21,3
		43,0	35,3	4,7	11,2	30,4	35,3
nombre de talles - épis	moyenne	3,6	5,4	3,7	5,0	13,0	3,6
	limites	1	0	1	3	7	3
		6	19	9	8	19	5

Tableau 39 : Fertilités comparées de la variété Atys et de la descendance d'un haploïde doublé provenant d'Atys.

Nombre de grains de l'épi le plus fertile	Fréquences	
	Atys	descendance d'un haploïde doublé
0	-	0,31
1 à 5	-	0,10
6 à 10	-	0,04
11 à 15	-	-
16 à 20	0,11	0,17
21 à 25	0,11	0,10
26 à 30	0,22	0,10
31 à 35	0,22	-
36 à 40	0,17	0,10
41 à 45	0,17	0,04
46 à 50	-	0,04

Enfin, une plante était en chimère avec des épis donnant des descendances correspondant à un monosomique, et d'autres épis semblables à celles d'un trisomique; quelques épis étaient totalement stériles.

Cette analyse confirme que les descendances d'HD peu fertiles et hétérogènes proviennent d'un aneuploïde, voire même d'un diploïde dont les mitoses ou méïoses sont mal régulées.

Ainsi donc des hétérogénéités observées au champ dans certaines descendances d'HD peuvent être expliquées par la présence d'aneuploïdes parmi les graines retournées aux sélectionneurs. Des dénombrements chromosomiques effectués sur des grains issus de plantes hétérogènes observées en champ, ont confirmé cette possibilité.

La présence d'anomalies chromosomiques n'est pas sans poser quelques problèmes pour l'utilisation de cette technique dans des programmes de sélection.

La fréquence des plantes qui présentent des anomalies peut paraître plus élevée chez les HD que chez les plantes obtenues par sélection classique en régime d'autofécondation. Il faut tout d'abord rappeler la grande viabilité des aneuploïdes chez le Blé : de nombreux nullisomiques sont viables, et tous les monosomiques, monoditélosomiques, trisomiques ... sont viables, alors que chez d'autres espèces comme l'Orge, il n'existe pas de monosomiques connus - KASHA 1974 (482).

Il est probable également qu'il n'existe pas la même sélection gamétique en culture d'anthères qu'en régime d'autofécondation. Ainsi, en sélection traditionnelle, on exploite la variabilité génétique criblée par les autofécondations successives, alors qu'en culture d'anthères, ce sont les conditions de culture qui criblent les combinaisons génétiques viables. Ces deux systèmes de reproduction modifient différemment les fréquences des génotypes.

Le matériel de départ peut également jouer un rôle important. Chez le Blé, il semble qu'il y ait plus d'anomalies chromosomiques dans les HD obtenus à partir de certaines F_1. Il serait intéressant d'étudier s'il existe une corrélation entre les anomalies chromosomiques du matériel de départ et celle des HD.

Certains hybrides F_1 entre génotypes très éloignés présentent souvent des anomalies de méïose. C'est le cas lorsque l'un des géniteurs possède un fragment ou un chromosome d'une autre espèce (Seigle pour les variétés Clément et Aurora, Aegylops pour Roazon, Agropyrum pour Eagle). C'est aussi le cas lorsque les géniteurs possèdent une ou plusieurs translocations. Il faut également signaler l'existence de lignées ou variétés dites infixables malgré un nombre important d'autofécondations - GOLOGAN et DORNESCU 1974 (339). Il n'est pas certain que l'androgenèse ou toute autre technique d'obtention d'haploïdes doublés, puisse résoudre tous les problèmes qui se posent pour ces variétés : il est possible d'obtenir un haploïde doublé homozygote et infixable si l'instabilité est associée à un gène lié à un caractère recherché par le sélectionneur.

Un autre point rarement étudié concerne la stabilité chromosomique des différents génotypes en culture d'anthères. Il n'a pas été prouvé que la culture in vitro induise systématiquement

des anomalies chromosomiques. Dans le cas du Blé, nous pensons que certains génotypes peuvent être plus instables en culture, en particulier les génotypes résultant de lignées de substitution interspécifique ou présentant plusieurs translocations les uns par rapport aux autres. Les chromosomes substitués ou les fragments transloqués seraient plus instables en culture in vitro et aboutiraient à la formation de plantes aneuploïdes. En quelque sorte, la culture in vitro pourrait révéler la stabilité chromosomique du matériel, tout comme la mutagenèse révèle la fragilité de l'ADN de certains génotypes.

L'utilisation de l'androgenèse in vitro a permis de mettre en évidence un problème qui existe en sélection classique, mais que les sélectionneurs écartent le plus souvent lors du choix des plantes les plus fertiles.

Quoiqu'il en soit, la technique de culture d'anthères in vitro permet d'obtenir,dans la plupart des cas, des plantes haploïdes doublées stables. Il importait de mieux connaître le comportement de ces plantes en champ.

IV. INTERET DES HAPLOIDES DOUBLES EN SELECTION

L'un des intérêts de l'androgenèse est la création variétale. Aussi, c'est chez le Tabac que les recherches ont abouti le plus rapidement : des variétés ou des lignées améliorées ont pu être obtenues par culture d'anthères - OINUMA et YOSHIDA 1974 (700), NAKAMURA et coll 1974, 1975 (622,624), CHAPLIN et coll 1980 (139), ESPINO et CAPOTE 1980 (298). Les chercheurs chinois ont montré qu'il était possible, outre le Tabac -ANONYMES 1974 (20)-, de créer des variétés de Céréales - ANONYMES 976 (30), HU 1978 (431), ANONYMES 1978 (41), HU et SHAO 1981 (438)-. Par ailleurs, chez l'Orge, des variétés haploïdes doublées, dont Mingo, ont été obtenues en utilisant la technique de croisement interspécifique - HO et JONES 1980 (416)-. Enfin,des haploïdes doublés d'Asperge sont à l'origine de matériel commercialisé en France - DORE 1982 (255)-.

L'une des particularités de notre travail est qu'il s'insère dans des schémas de sélection. Les plantes haploïdes doublées obtenues sont soumises au système classique de sélection. Le matériel HD est semé en conditions de champ. Durant les deux premières générations de multiplication en pépinière, les observations portent sur l'homogénéité et la stabilité des HD, et permettent d'effectuer un tri sur la base des critères habituels : sensibilité aux maladies, aspect, fertilité et variabilité. Les lignées HD retenues sont alors placées en essai rendement, afin de déterminer leur valeur agronomique. L'étude qui suit porte donc sur la sélection en pépinières, sur la variabilité observée entre les différents HD d'une même origine, sur la valeur agronomique et enfin sur l'utilisation des HD en sélection.

Le tableau 40 indique l'évolution du matériel obtenu par androgenèse durant les quatre premières années de notre travail. Sur 739 plantes régénérées, un peu plus de la moitié ont pu être semées en pépinière (Figures 25 et 26). Ceci résulte des pertes observées, lors du repiquage en pots (infections, plantes anormales en tube, système racinaire défectueux), par suite de la phytotoxicité de la colchicine, et du fait de la fertilité réduite de certaines plantes.

163 lignées HD ont été multipliées deux foix. Après sélection, 102 ont été retenues pour être testées dans des essais rendement.

Figure 25 : Haploïdes doublés de l'origine 34, lors de la première génération de multiplication en pépinière (juin 1979).

Figure 26 : Haploïde doublé de l'origine 610, en pépinière de sélection, lors de la première génération de multiplication (juin 1980).

A l'issue de ces essais, un Etablissement de sélection a présenté deux lignées HD aux services officiels d'inscription au catalogue des variétés françaises.

A. Observations réalisées durant les générations de multiplication :

Les graines provenant d'haploïdes doublés sont récoltées épi par épi, et chaque ligne de pépinière correspond à un épi. De ce fait, le jugement porte sur des lignées en conditions normales de culture.

a) Homogénéité, stabilité : La plupart des haploïdes doublés sont homogènes. Seules 8 descendances se sont révélées hétérogènes en première génération de multiplication (Tableau 41). Nous n'avons pas considéré comme hétérogènes les descendances possédant des mutants de types connus en sélection classique (effilé, speltoïdes,..). Les hétérogénéités observées portent sur les caractères morphologiques tels que la taille, la coloration.

Les analyses de gliadines effectuées sur les graines issues de plantes haploïdes doublées ont confirmé l'homogénéité observée en champ. De ce fait, les HD ont un comportement tout à fait normal et correspondant à celui attendu de la part de plantes homozygotes.

En seconde génération de multiplication, seules 3 lignées HD ont été éliminées par suite d'hétérogénéités (Tableau 41). L'ensemble des HD est donc parfaitement stable en ce qui concerne les caractères morphologiques étudiés en champ. Cette stabilité se retrouve également lorsque l'on étudie les diagrammes électrophorétiques des gliadines de grains provenant de différentes générations de multiplication.

Les études cytologiques ont montré que les descendances hétérogènes pouvaient provenir d'anomalies chromosomiques, mais elles peuvent également provenir d'anomalies génétiques telles que la présence de gènes favorisant l'allogamie, dont la conséquence est un fort taux d'hybrides naturels.

b) Sélection : Le tableau 40 montre que 60% des HD ont été éliminés dès la première année de culture en champ. La sélection est demeurée peu sévère, puisqu'il s'agissait d'un matériel nouveau.

Tableau 40 : Etat d'avancement en sélection du matériel obtenu par androgenèse :

Principales étapes	Effectifs observés	
Plantes régénérées en tube	739	
Plantes en première génération de multiplication	408	
HD éliminés	245	(60%)
Plantes en seconde génération de multiplication	163	
HD éliminés	40	(9,8%)
HD en troisième multiplication	2	
HD conservés sans essai, puis éliminés	5	
HD en cours d'observation	14	
Plantes en premier essai rendement	102	(25%)
HD éliminés	54	
HD en cours de test	28	
Plantes en second essai rendement	20	(4,9%)
HD éliminés	10	
HD en cours de test	3	
Plantes en troisième essai rendement	5	
dont HD déposé à l'inscription)	2	(0,50%)
HD éliminés	2	

La principale cause d'élimination (Tableau 41) est la sensibilité aux maladies (principalement rouilles et septoriose). Près de 80% des HD éliminés le sont sur la base de ce critère, et certaines familles d'HD provenant d'une même origine se sont toutes révélées sensibles. Les autres sources d'élimination concernent l'aspect, et en particulier la taille.

En seconde génération de multiplication, 25% des HD restant sont encore éliminés. Ce taux élevé s'explique par le fait, que dans certains cas le faible nombre de grains semés en première multiplication n'a pas permis d'effectuer un tri efficace.

Ainsi, à partir de la sélection qui a été appliquée aux HD, 102 soit 25% ont été retenus pour être testés en essai rendement.

Tableau 41 : Critères d'élimination des haploïdes doublés en pépinière :

Critères		Nombre d'haploïdes doublés éliminés		
		Première multiplication	Seconde multiplication	Troisième multiplication
Maladies		199	18	2
Fertilité réduite		4	5	-
Aspect	grand	3	2	
	court	5	1	-
	compact	3	2	-
	non satisfaisant	12	4	-
Sensibilité aux lapins		-	1	-
Sensibilité au froid		5	3	-
Tardifs		6	1	-
Hétérogènes		8	3	-
TOTAUX		245	40	2

B. Valeur agronomique :

Lorsque les quantités de semences sont suffisantes, c'est-à-dire après 1 ou 2 ans de multiplication, les HD retenus par les sélectionneurs sont comparés aux témoins officiels dans des essais rendement. S'agissant d'un matériel nouveau pour les sélectionneurs, beaucoup d'HD ont été conservés, ce qui explique les résultats parfois faibles qui ont été obtenus. Au cours de cette étude, nous considèrerons trois aspects : le premier concerne une comparaison entre des HD et leurs parents, le second met en parallèle des HD et les lignées classiques obtenues à partir des mêmes croisements,enfin nous nous sommes intéressés à la valeur des HD par rapport aux témoins officiels qui sont les quatre variétés les plus cultivées en France.

a) Valeur des HD par rapport à leurs parents : A partir de la F_1 (Wizard x Iéna), sept HD ont été retenus pour être placés en

essai rendement dans trois zones différentes, en comparaison avec leurs parents, ainsi que les témoins officiels (Tableau 42). Aucun HD n'est inférieur au plus faible parent, ce qui est relativement normal puisque n'ont été placés en essais que les seuls HD choisis par le sélectionneur. Dans la zone Nord (Zone I) et la Beauce (Zone II), la majorité des HD sont compris entre les deux parents ou sont au niveau du meilleur parent. Seul un HD (HD 79) est supérieur en Beauce au meilleur parent. Cependant, en zone Sud (Zone IV), les HD présentent des potentialités intéressantes puisque deux sont nettement supérieurs au meilleur parent. Les potentialités de cette F_1 s'expriment mieux en zone Sud, où le rendement moyen des HD est de 101,8% du témoin, contre 94,7 en Beauce et 93,5 en zone Nord. La comparaison avec les témoins officiels montre que peu d'HD sont supérieurs à la moyenne des témoins. Ainsi, dans le cas étudié, les transgressions observées pour le rendement sont faibles.

b) Valeur des HD et des lignées classiques issues des mêmes croisements : Dans trois cas, nous avons pu comparer les HD provenant de matériel avancé en sélection généalogique (F_5) avec les lignées sélectionnées par voie traditionnelle à partir de la F_5 de ces mêmes croisements. Ce type de comparaison n'a pu être réalisé lorsque les HD proviennent de F_1 ou de F_2, car nous ne disposions pas alors des lignées classiques, compte tenu du gain de temps réalisé avec le matériel HD.

La comparaison a été effectuée dans trois zones différentes (la zone III correspond à l'Aveyron). Les résultats de ces essais (Tableau 43) ne révèlent aucune différence significative entre les deux systèmes de sélection, pour le matériel testé, les rendements sont très voisins et diffèrent au plus de 4%. Aussi peut-on conclure qu'avec du matériel avancé en sélection généalogique, les HD provenant de culture d'anthère ne font que fixer définitivement le matériel, et n'apportent aucun gain de rendement. Dans cette optique, un très petit nombre d'HD sont suffisants pour obtenir rapidement la fixité désirée pour les tests d'inscription (Figure 27).

Tableau 42 : Comparaison entre les HD provenant de la F_1 D_1 (Wizard x Iéna) et les variétés Wizard et Iéna. Essais rendement réalisé en 1982 par les Etablissements Desprez.

Génotypes		Rendement en pourcentage du témoin ZONE I	ZONE II	ZONE IV
Témoins	Fidel	110,0	99,2	
	Talent	103,8	101,3	100
	Top	95,0	96,1	
	Hardi	91,2	103,4	
	Iéna	99,2	93,8	89,6
	Wizard	83,0	78,5	99,9
D_1	HD 75	$91,4^{-}$	$93,7^{-}$	$116,9^{++.}$
	HD 76	$88,0^{-}$	$84,0^{--}$	94,5
	HD 77	$86,6^{-}$	$92,3^{-}$	102,1
	HD 78	$89,9^{-}$	$90,4^{-}$	$111,1^{++.}$
	HD 79	102,9	$108,5^{+.}$	101,8
	HD 80	95,0	96,4	$89,1^{--}$
	HD 81	100,4	97,6	97,6
moyenne des parents		91,1	86,2	94,8
moyenne des HD		93,5	94,7	101,8
ppds		5,7	6,0	8,8

$$\text{Témoin} = \frac{\text{Fidel} + \text{Talent} + \text{Top} + \text{Hardi}}{4}$$

++ : significativement supérieur au meilleur témoin (5%)
+ : significativement supérieur au témoin (5%)
- : significativement inférieur au témoin (5%)
-- : significativement inférieur au plus faible témoin (5%)
. : significativement supérieur au meilleur parent (5%).

Tableau 43 : Comparaison d'HD provenant de F_5 généalogiques, avec les lignées "classiques". Essais rendement réalisés en 1980 par la R.A.G.T.

Génotypes		Rendement en pourcentage du témoin		
		ZONE I	ZONE II	ZONE III
Témoins	Top°	99,1	108,5	93,7
	Talent°	108,5	106,3	105,6
	Capitole°	81,7	96,5	
	Lutin°	110,8	88,7	
	Moisson			113,0
	Ducat			102,5
	Choisy			84,5
46	Classique	$83,2^-$	99,0	95,7
	HD_1	85,6	101,6	98,8
50	Classique	97,2	101,4	$80,6^-$
	HD_{21}	93,9	99,0	94,1
141	Classique	104,9	$110,2^+$	-
	HD_{22}	102,6	$108,4^+$	$91,8^-$
	ppds			

° : Témoin officiel d'inscription au catalogue en 1980.

- et + : cf. Tableau 42.

Figure 27 : Haploïde doubé (HD_{21}) et matériel classique provenant de l'origine 50, en essai rendement à Druelle (juin 1980).

c) Valeur des HD par rapport aux témoins officiels : Dans tous les essais rendement mis en place avec les HD, la comparaison avec les témoins, souvent les meilleures variétés actuelles, a été réalisée afin de juger la valeur des HD. Dans la plupart des cas, les essais ont été implantés dans trois zones correspondant à des régions céréalières différentes : Nord, Beauce et Sud de la France. Des résultats sont reportés dans le Tableau 44. Les HD obtenus à partir de deux F_2 et de deux F_6 "bulk" ont été comparés. Dans ces exemples, seule l'origine 34 a donné des HD qui ont des rendements significativement supérieurs aux témoins officiels. Pour les autres origines testées, les rendements sont soit du niveau des témoins soit nettement inférieurs comme dans le cas du croisement 54. Ces résultats confirment l'importance du croisement dans l'expression des potentialités. Il se confirme également que certains HD, tout comme certaines variétés, sont mieux adaptés à certaines régions bien particulières. Cette étude montre qu'avec les HD, il est possible de créer des lignées intéressantes d'un point de vue agronomique. Pour les meilleurs des HD, les résultats ont pu être confirmés la seconde année d'essais, et deux d'entre eux sont présentés à l'inscription au catalogue des variétés françaises.

Tableau 44 : Valeur agronomique des HD. Essais rendement réalisés en 1980 par les Etablissements Desprez.

Génotypes		Rendement en pourcentage du témoin ZONE I	ZONE II	ZONE IV
Témoins	Clément	97	95	
	Rivoli	103	104	104
	M. Huntsman	100		
	Talent		101	102
	Top			94
F_6 "bulk"				
31	HD 31	99	101	101
	HD 32	103	104	90
	HD 33	96	99	87^{-}
	HD 34	95	95	90
	HD 35	105	101	104
54	HD 36	80^{--}	80^{--}	91
	HD 37	80^{--}	70^{--}	103
	HD 38	73^{--}	50^{--}	83^{-}
	HD 39	83^{--}	80^{--}	101
	HD 40	70^{--}	67^{--}	93
F_2 34	HD 45	109^{+}	109^{+}	107
	HD 46	104	109^{+}	96
	HD 47	100	104	87^{-}
	HD 48	114^{++}	102	108
	HD 49	115^{++}	101	111
	HD 50	111^{++}	110^{+}	81^{--}
	HD 51	101	116^{++}	83^{-}
74	HD 52	80^{--}	92^{-}	92
	HD 53	88^{--}	88^{--}	88
	HD 54	95	109^{+}	88
	HD 55	94	99	107
	HD 56	94	103	80^{--}
	ppds	8,2	6,8	12,8

++, +, -, -- : cf. Tableau 42.

Les conclusions qui se dégagent de cette étude des essais rendement sont multiples. La culture d'anthère permet de fixer rapidement des combinaisons intéressantes. La valeur des HD dépend pour une grande part des potentialités du croisement, et de la génération de sélection du matériel utilisé pour l'androgenèse. Les possibilités de fixer des combinaisons transgressives par rapport aux parents sont réelles. L'androgenèse peut également se concevoir pour obtenir la fixité de lignées proches de l'inscription et d'un bon niveau agronomique.

C. Variabilité observée après androgenèse :

Un aspect aussi intéressant que la valeur agronomique des HD concerne la variabilité qu'expriment les HD. En ce qui concerne le rendement, il est difficile de se faire une idée très précise de la variabilité, du fait du tri imposé par le sélectionneur. Pour cette étude, nous pourrons distinguer d'une part les générations peu avancées en sélection (F_1,F_2,BC_1) et d'autre part les systèmes de sélection, généalogique ou "bulk" pour le matériel plus avancé.

a) Variabilité des HD obtenus à partir de F_1,F_2 et BC_1 :
L'étude de la variabilité a porté principalement sur l'analyse des gliadines des HD. Le tableau 45 regroupe les résultats obtenus. Le nombre de diagrammes différents observés dans chacune de ces analyses est relativement important et montre l'étendue de la variabilité observée (Figures 28-29). L'origine D_1 pour laquelle 42 HD ont été régénérés, a fait l'objet d'une étude particulière. Les HD, la F_1, les variétés parentes ainsi que 43 grains de la F_2 ont été analysés (Figure 30). Nous constatons les faits suivants :

- aucun HD ne présente de bande qui soit absente de l'un ou l'autre des parents;
- aucune des bandes existant dans la F_1 n'a été perdue par l'ensemble des HD ou des grains F_2;
- la variabilité observée dans 42 HD est plus élevée que celle de 43 grains F_2. Les HD possèdent 16 diagrammes différents, contre 9 pour la F_2, et 8 diagrammes sont communs aux grains HD et F_2. Seul un diagramme F_2 n'a pas été retrouvé parmi les

grains F_1, et nos effectifs limités, ne révèlent pas d'avantage sélectif pour certaines combinaisons;

- quelques HD ont perdu une ou plusieurs bandes présentes chez les deux parents. Dans certains cas, il pourrait s'agir d'une simple recombinaison. Dans d'autres cas, où la descendance de ces plantes s'est révélée hétérogène morphologiquement, une anomalie chromosomique peut expliquer cette perte.

Tableau 45 : Analyse des gliadines d'haploïdes doublés obtenus à partir de F_1, F_2 et BC_1.

Origines	Génération de sélection	Nombre d'HD observés	Nombre de diagrammes différents
D_1	F_1	42	16
D_2		9	7
D_3		9	8
01	F_2	9	8
34		13	8
74		13	10
81		11	10
100		4	2
487	BC_1	5	4
610		22	14

Pour cette F_1, 7 haploïdes doublés ont été placés en essai rendement (Tableau 42). Il est à noter que, même en ce qui concerne les HD sélectionnés, une grande variabilité existe à ce niveau, puisque dans un même essai les différences de rendement peuvent atteindre 27%. Certains HD (HD_{79}) peuvent être bons dans les trois zones testées, d'autres sont moyens dans deux zones et bons dans la troisième, d'autres enfin sont médiocres dans les trois régions d'essais.

Cette étude de quelques HD issus de jeunes générations de

sélection montre qu'il est possible d'obtenir une variabilité importante, même avec des effectifs très restreints, comme cela est fréquemment le cas.

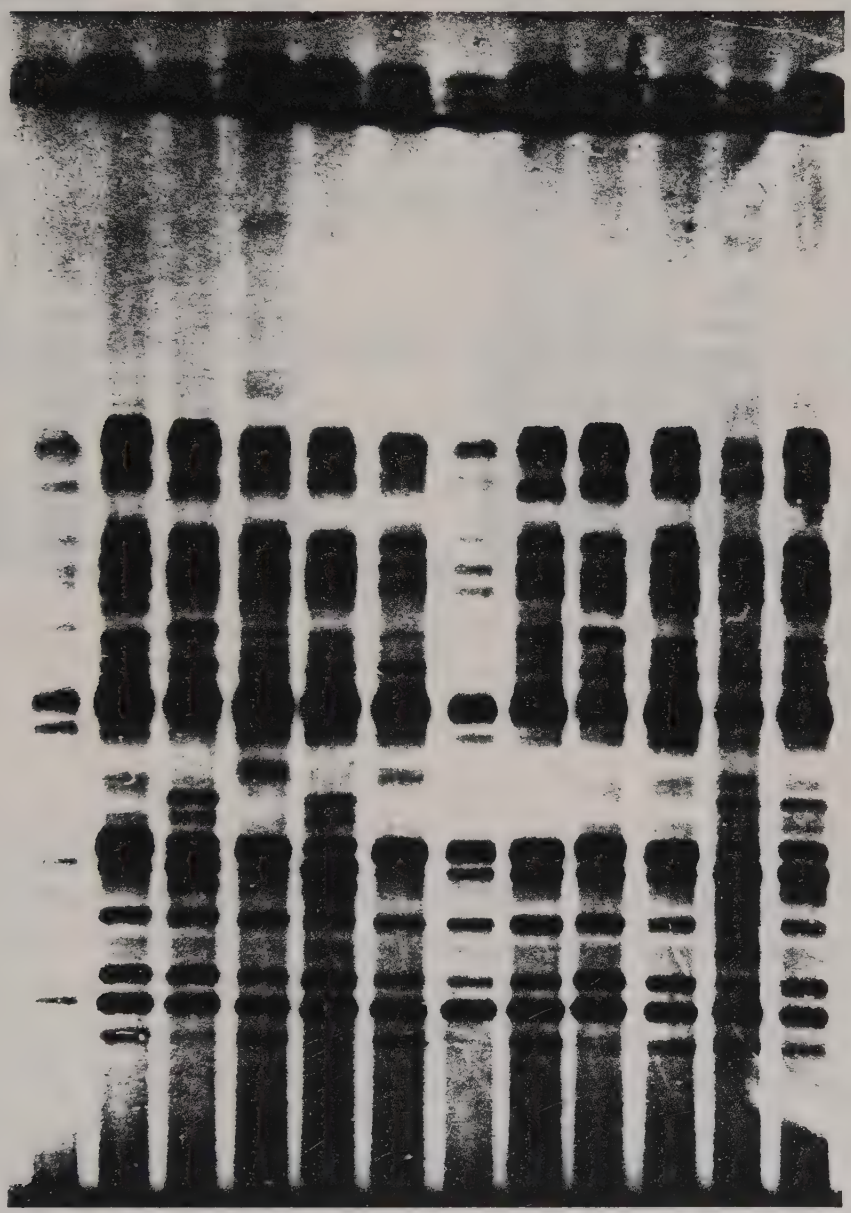


Figure 28 : Diagrammes électrophorétiques des gliadines. De gauche à droite : les deux variétés parentes, la F_1 (D_3) et 9 HD.

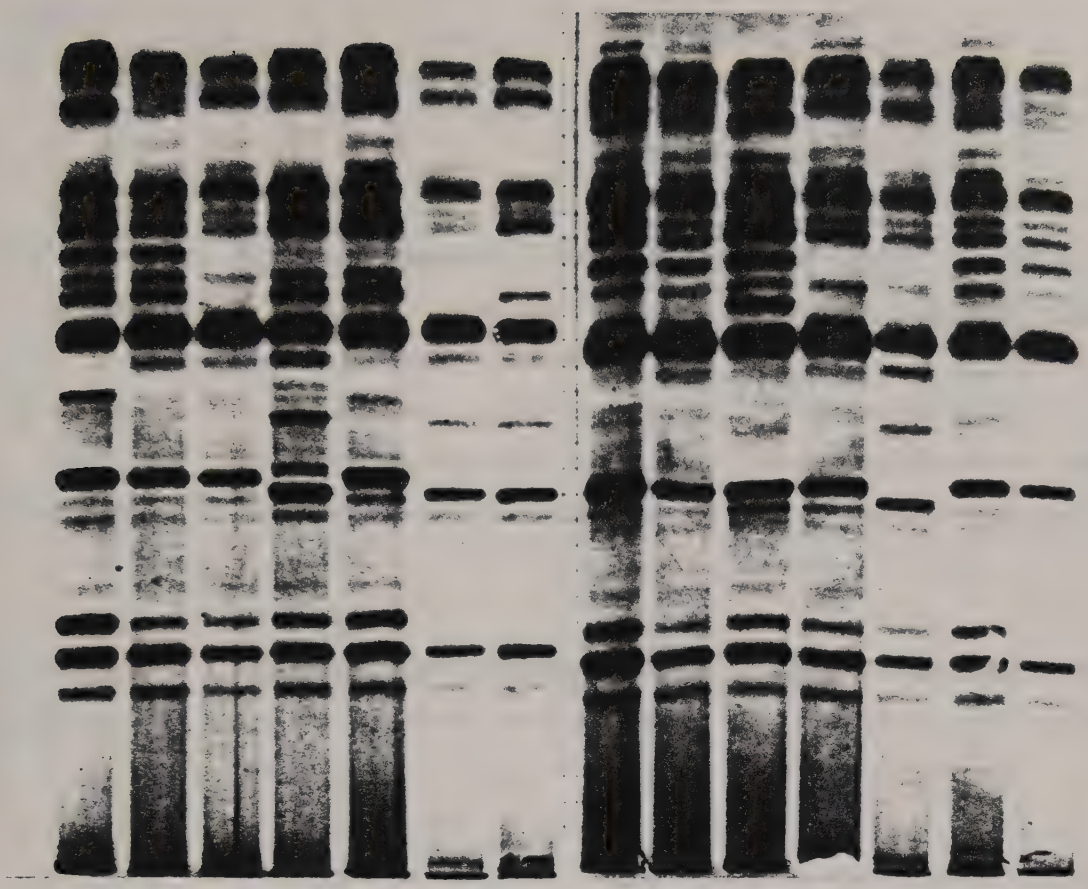


Figure 29 : Diagrammes électrophorétiques des gliadines de 13 HD provenant de l'origine 34 (F_2). Le diagramme de gauche provient d'un grain F_2.

b) Variabilité des HD provenant de générations avancées et de systèmes de sélection différents : Le Tableau 46 donne un aperçu des résultats obtenus par l'analyse des gliadines. Nous constatons que pour une F_4 généalogique, la variabilité peut encore être importante. Cette variabilité a tendance à diminuer en F_5 et F_6 généalogique. Il est difficile de conclure pour les F_6 bulk, mais pour les 16 HD d'origines diverses, 10 diagrammes électrophorétiques sont différents.

Pour une origine génétique (56), une étude plus approfondie de la variabilité a pu être réalisée (Tableau 47) en comparaison avec le matériel issu de la sélection généalogique traditionnelle. Ce matériel en F_5 généalogique nous a fourni 17 HD qui ont été observés en champ. Pour un certain nombre de caractères tels que la date de floraison, les diagrammes des gliadines, la sensibilité à la rouille jaune et au piétin, les HD très peu va-

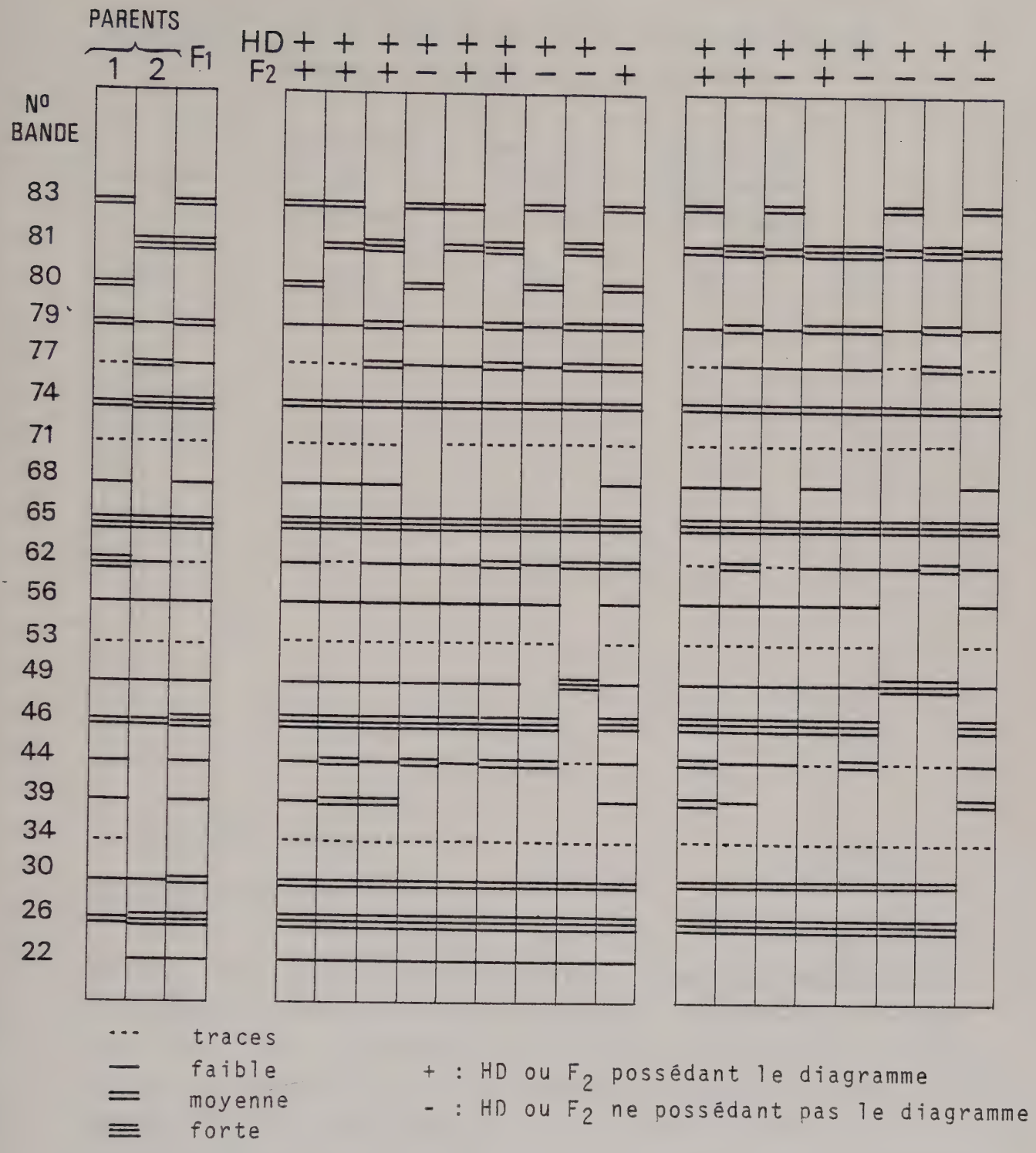


Figure 30 : Représentation schématique des diagrammes des gliadines de deux variétés, de leur F_1, de grains F_2 et des HD issus de cette F_1 (D_1).

Tableau 46 : Analyse des gliadines d'haploïdes doublés obtenus à partir de F_4, F_5 F_6 et F_7.

Origines	Génération de sélection	Nombre d'HD observés	Nombre de diagrammes différents
426	F_4 G	40	15
56	F_5 G	19	2
141		3	1
200	F_6 G	9	1
212		8	2
305		3	1
23	F_6 B	2	2
26		2	1
31		6	3
54		6	4
773	F_7 B	14	5

G = sélection généalogique.

B = sélection "bulk".

riables ne diffèrent pas du matériel classique témoin. Pour d'autres caractères tels que la taille des plantes, la longueur de l'épi, la sensibilité à la septoriose et à la rouille brune, le matériel HD est en général inférieur au témoin classique, mais ne révèle pas une très grande variabilité. Par contre, pour le nombre d'épillets et le poids de 1000 grains, la variabilité entre HD est plus importante, de part et d'autre de la lignée classique. Des résultats très voisins sont signalés chez le Tabac - DEATON et coll 1982 (205).

Ainsi, la variabilité observée dans ce cas est très peu importante : l'analyse des gliadines montre que 15 HD ont des diagrammes identiques (Figure 31), de même pour l'essai rendement (Tableau 48 et Figure 32) la plupart des HD ont des rende-

Tableau 47 : Variabilité des HD issus d'une F_5 généalogique (origine 56).

Caractères observés		Taille de la plante (cm)	long. de l'épi (cm)	nombre d' épillets	date de floraison	septoriose (note)	Piétin verse (note)	Rouille jaune (note)	Rouille brune (noté)	gliadines	Poids de 1000 grains (g)	Rendement (% des témoins)
Valeur moyenne du témoin		86,0	7,2	14,9	12 juin	5	6	4	1	-	30,6	-
Valeur des HD	moyenne	81,2	6,3	14,2	12 juin	8,2	7	4,4	2,3	-	30,3	103,3
	limite sup.	85,6	7,2	15,3	13 juin	9	9	6	5	-	37,6	109,3
	limite inf.	73,4	4,3	13,2	10 juin	5	6	3	1	-	24,7	95,5
situation des HD par rap. au témoin (effectifs)	inf.	12	10	9	-	16	3	1	5	-	7	-
	iden.	5	3	3	17	1	14	16	8	15	6	17
	sup.	-	-	2	-	-	-	-	-	2	4	-

notes : 1 : faible atteinte
9 : très forte atteinte

Tableau 48 : Essai rendement réalisé à partir de 17 HD provenant de la F_5 généalogique (56). Druelle (ZONE III) 1979.

Génotypes		Résultats en pourcentage du témoin
Témoins	Champlein	103,3
	Top	103,0
	Heima	100,9
	Joss	99,6
	Capitole	92,8
56	HD_4	109,3+
	HD_5	109,0+
	HD_6	107,9+
	HD_7	106,9
	HD_8	105,4
	HD_9	105,4
	HD_{10}	104,8
	HD_{11}	104,1
	HD_{12}	103,5
	HD_{13}	103,1
	HD_{14}	102,6
	HD_{15}	102,2
	HD_{16}	100,1
	HD_{17}	99,8
	HD_{18}	98,7
	HD_{19}	97,7
	HD_{20}	95,5
	ppds	7,1

+ : significativement supérieur à la moyenne des témoins (5%).

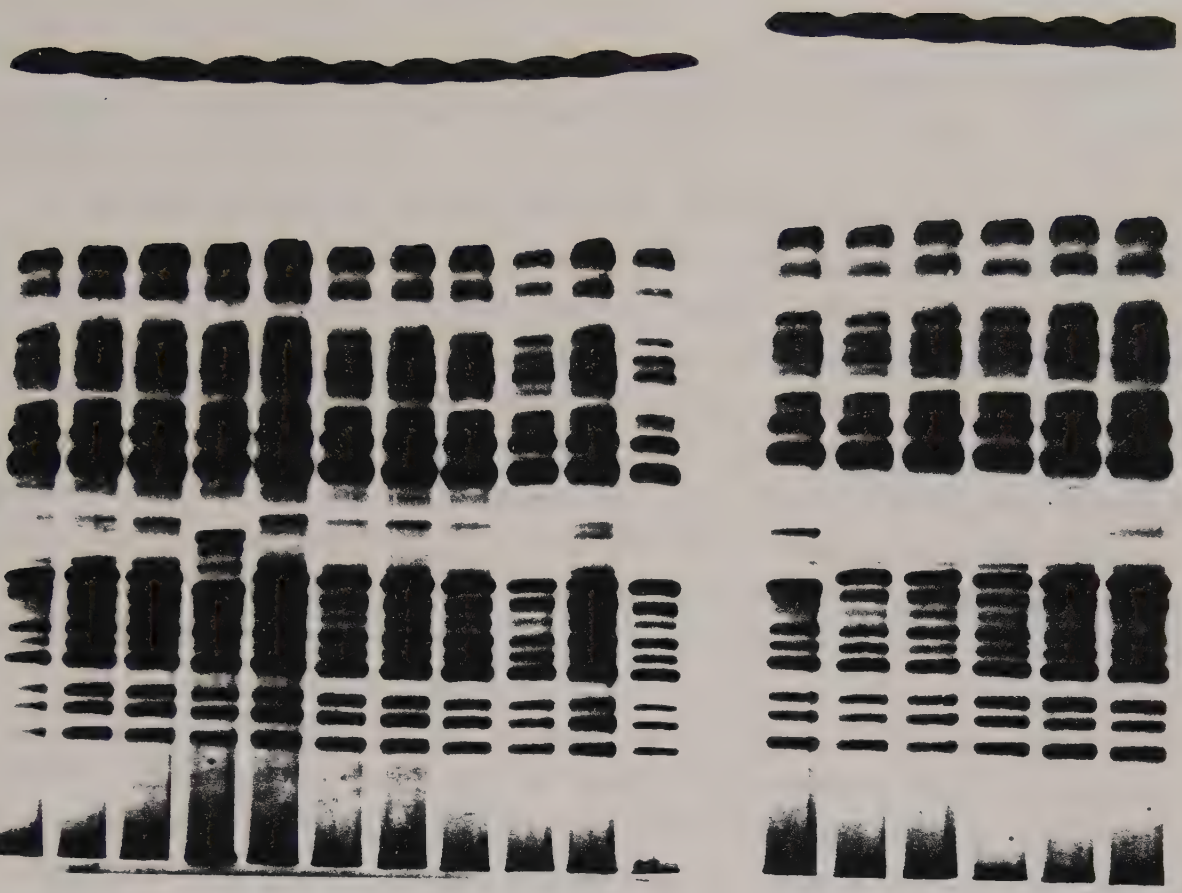


Figure 31 : Diagrammes électrophorétiques des gliadines de 17 haploïdes doublés issus de la F_5 généalogique (56).

Figure 32 : Haploïdes doublés de l'origine 56. De gauche à droite : HD_7, HD_9 et HD_{20}, en essai rendement à Druelle (juin 1979).

ments équivalents, seuls trois sont significativement supérieurs au témoin, cependant aucun HD ne diffère de la lignée issue de sélection classique.

Cette étude de la variabilité est très incomplète, cependant elle montre que selon la génération de sélection, le schéma de sélection, les parents qui interviennent dans le croisement, la culture d'anthère peut aboutir à des plantes très différentes. D'un point de vue pratique, pour le sélectionneur, le point le plus important est la possibilité d'extraire les génotypes intéressants, et de ce fait, l'étude de la variabilité ne représente qu'une partie secondaire. D'autre part, il faut avoir présent à l'esprit le fait qu'une trop grande variabilité conduit à éliminer beaucoup de matériel en cours de sélection.

c) Variabilité des HD provenant de variétés : Un des points fréquemment débattus concerne la variabilité observée après culture d'anthères de variétés. Dans le cas du Blé, toutes les variétés ne réagissent pas de la même manière, les unes n'induisant pas de variabilité -CHEN et LI 1978 (146), BAENZIGER et coll 1979 (61), SCHAEFFER et BAENZIGER 1981 (840)-, les autres étant à l'origine d'une variabilité plus ou moins élevée -DE BUYSER et PICARD 1975 (208), PICARD et coll 1978 (751), HU et coll 1980 (435), BAENZIGER et coll 1982 (62)-. Lorsque les haploïdes doublés obtenus par androgenèse sont différents du matériel de départ, les variations observées portent sur des caractères morphologiques ou végétatifs (taille, date d'épiaison, tallage, présence de barbes, ...) et biochimiques (gliadines).

- Une partie de ces variations peuvent avoir pour origine le matériel parental -DEATON et coll 1982 (205)-. De nombreux accidents peuvent venir troubler l'homogénéité d'une variété. Eliminons d'emblée les mélanges trop fréquents, il reste alors à prendre en compte l'hétérozygotie résiduelle, les mutations et les allofécondations accidentelles.

Il est généralement admis qu'une dizaine de générations d'autofécondations suffisent pour assurer une bonne homogénéité, cependant tous les sélectionneurs ont rencontré des variétés beaucoup plus longues à fixer. Lors de la sélection, on ne contrôle qu'un nombre limité de caractères correspondant à 150-200 gènes,

aussi peut-il persister une variabilité pour les caractères non sélectionnés, accentuée par le fait que la sélection s'effectue principalement au niveau de la valeur agronomique. Ainsi, par exemple, la variété Arminda n'est pas fixée lors du test de coloration des grains au phénol. Maris Huntsman, Marquis, Kolibri sont hétérogènes lors de l'analyse électrophorétique des gliadines. Par ailleurs, diverses hypothèses ont été proposées pour expliquer le maintien d'un certain niveau d'hétérozygotie dans les variétés - PANDEY 1974 (723)-.

Les mutations constituent une source non négligeable de variation. Elles peuvent toucher un gène, un fragment de chromosome ou un chromosome entier. Les mutations les plus fréquentes dans les variétés de Blé sont les mutations compactoïde (épi compact), speltoïde et effilé (épi allongé), présence de barbe, couleur de feuillage (émeraude). La plupart sont récessives. Les mutations compactoïde, speltoïde et effilé se rencontrent chez toutes les variétés de Blé tendre, à des fréquences variables.

La présence d'aneuploïdes dans les variétés de Blé a été confirmée dès 1961 par RILEY et KIMBER. Ils observent une fréquence moyenne de 1,08% d'aneuploïdes dans des lots de semences de variétés cultivées (Cappelle, Hybride 46). Cette aneuploïdie ne se traduit pas nécessairement par des différences morphologiques, elle n'est alors décelable que par une analyse cytologique. Deux variétés actuellement inscrites au catalogue français présentent des taux anormalement élevés de "hors-types", de l'ordre de 0,3% pour Adam et 0,8% pour Magister. L'analyse cytologique a confirmé la présence de plantes monosomiques dans ces variétés. Ces anomalies semblent être induites par une méïose imparfaite, dont l'analyse a révélé que Magister possède une structure hétérozygote stable, qu'une cellule mère du pollen sur 3 présente des univalents chez Roazon, et qu'une cellule mère du pollen sur deux présente des multivalents chez Darius. Par ailleurs, chez le Blé tendre existent des gènes de sensibilité de la méïose à la température, portés par le chromosome 5D -RILEY 1958 (810)-.

Une autre cause de variabilité réside dans l'alloféconda-tion accidentelle, soit chez une plante dont l'aneuploïdie provoque une stérilité mâle partielle, soit chez une plante imparfaitement autogame. Ainsi, la variété Courtot peut présenter une

fréquence de 5% d'hybrides dans sa descendance, et Magister 0,5%.

Ainsi donc, quelques variétés aujourd'hui inscrites au catalogue ne répondent pas au critère de fixité attendu. Il semble y avoir recrudescence de variétés ayant une haute fréquence de plantes aberrantes : Adam, Apexal, Courtot, Magister, Iéna, et en Angleterre Brigand. Certaines variétés déjà anciennes présentent également ce genre d'inconvénient : Cappelle, Manella, Caribo. C'est le cas aussi pour de nombreuses variétés provenant des pays de l'Est (Aurora, Kavkaz), ou de Chine, où les critères d'inscription sont beaucoup moins stricts qu'en France, puisque l'on considère par exemple que la fixité est atteinte en F_6. Il est à noter que, parmi les nombreuses variétés imparfaitement pures, beaucoup possèdent un chromosome transloqué (Blé-Seigle, Blé-Aegilops) ou ont dans leur pedigree la variété Norin 10. La culture d'anthères sur des plantes provenant de variétés présentant ces différents types d'anomalies peut donc aboutir à fixer une variabilité différente de celle du parent, dans la mesure où la population de microspores constitue un réservoir de variabilité.

- Une autre source de variation réside dans la culture de tissus gamétiques. Ainsi, chez le Blé, nous avons produit des plantes spontanément aneuploïdes ou diploïdes hétérozygotes de structure. Des remaniements chromosomiques peuvent se produire durant la phase de culture in vitro, et donc aboutir à des plantes différentes. Ces anomalies sont plus fréquentes lorsque l'on est en présence de certains génotypes. Par ailleurs, auxines et cytokinines peuvent induire des mutations. De même, chez le Blé, une augmentation de la température de culture des anthères se traduit non seulement par une augmentation du nombre de plantes obtenues, mais également par une fréquence plus élevée d'aneuploïdes. L'étude de la variabilité induite par la culture d'anthères nécessite des outils fins d'analyse : une translocation sur un génome haploïde n'est décelable que par une étude de méïose en comparaison avec la structure génomique de la variété de départ.
- Une troisième source de variation concerne les modifications des ADN chloroplastique et mitochondrial. Jusqu'à présent peu d'études ont été entreprises dans ce domaine. Cependant, l'analyse

par les enzymes de restriction de l'ADN mitochondrial d'haploïdes doublés de Triticale, n'a pas permis de mettre en évidence des différences entre les HD et le matériel de départ.

D'autres hypothèses ont également été proposées pour expliquer la variabilité obtenue après culture d'anthères :

- l'une d'elles concerne les modifications héréditaires quantitatives et qualitatives de l'ADN nucléaire des haploïdes doublés de Nicotiana sylvestris obtenus par des cycles successifs d'androgenèse -DE PAEPE et coll. 1982 (1175)-. Les plantes HD observées possèdent en moyenne une quantité d'ADN supérieure de 10% à celle du matériel de départ, avec une augmentation importante des séquences hautement répétées. Le génome des HD présenterait une amplification des séquences hautement répétées riches en A-T et C-G, présentes dans le matériel de départ.
- une seconde théorie, de portée plus générale a été proposée par DEMARLY (1977). A partir de variétés lignées pures, l'on pensait extraire des HD identiques à la lignée pure de départ. Cela est vrai pour un certain nombre de plantes haploïdes doublées obtenues, mais avec une fréquence variable selon les espèces, apparaissent des HD différents. Ces variants sont stables durant plusieurs générations. Les analyses réalisées -ANDRE 1978 (17), KOUADIO 1981 (516)- indiquent que ces mnémovariants présentent de nouvelles caractéristiques transmissibles à leurs descendances, par voie maternelle.

Les variants sont l'expression d'infidélités de divers ordres (expression génique, chromosome, cytoplasme, programme de développement). Alors que le végétal normal est très fortement programmé et contraint par des tensions internes (tension de linkat,...) de plus en plus marquées à mesure qu'il se développe, tout prélèvement de tissus ou mieux de cellules, suivi d'une culture in vitro entraîne un relachement progressif des tensions. De ce fait, les éléments cultivés in vitro subissent des modifications dans les systèmes de contrôle des mutations, de la dérépression alternative de codes équivalents et du découpage intron-exon. Les variations des mécanismes qui contrôlent l'expression des gènes entraînent l'apparition, hors des réseaux de tension classiques, de régimes cytoplasmiques nouveaux et transmissibles (modifications épigénétiques). Ceux-ci sont, dans cette théorie, à l'origine de la diversité observée.

Tableau 49 : Gain de temps obtenu avec le matériel haploïde doublé, par rapport à la sélection traditionnelle :

génération de sélection	F_1	F_2	F_4G	F_6G	BC_1
gain de temps (année)	5	4	2-3	0-1	4

G : sélection généalogique

D. Gain de temps par rapport à la sélection traditionnelle :

Nous avons pu voir qu'un nombre limité d'HD permettait d'apprécier les potentialités d'un croisement et fournissait des génotypes intéressants pour le sélectionneur. Un des intérêts de l'utilisation de l'androgenèse réside dans le temps gagné. Le Tableau 49 basé sur les données observées montre que le gain de temps est de 5 ans lorsque l'androgenèse a lieu sur du matériel F_1. Ce gain s'annule pour du matériel avancé en sélection (F_6 généalogique). Dans ce dernier cas, l'androgenèse ne se conçoit uniquement que pour fixer la lignée.

Il s'agit en fait de gains moyens puisque nous savons que, par voie classique, le temps nécessaire à la fixation varie selon les croisements, de 8 à 10 ans. En outre, il n'est pas rare d'observer certaines lignées dites infixables en F_{10}, et dans ce cas, la culture d'anthères pourrait être utilisée dans la mesure où la non fixité n'est pas d'origine génétique.

E. Utilisation des HD :

a) Analyses génétiques : Nos observations montrent que les HD obtenus à partir de F_1 sont un matériel avantageux pour analyser le déterminisme génétique des bandes obtenues par électrophorèse des gliadines. Ainsi, malgré la relative faiblesse des effectifs HD, les diagrammes permettent de mettre en évidence l'existence de ségrégations mendéliennes pour la présence ou l'absence de quelques bandes (Tableau 50, voir également la Figure 30). Les ségrégations observées sont plus simple 1/2-1/2 au lieu de 3/4-1/4 pour les bandes 22, 39 et 68, et 3/4-1/4 au lieu de 15/16-1/16 pour les bandes 80-81. L'absence d'effets liés à l'hétérozygotie devrait

en outre permettre de mieux analyser le déterminisme génétique de l'intensité des bandes.

Figure 50 : Ségrégations observées pour la présence ou l'absence de bandes dans la F_2 et les HD de l'origine D_1 :

numéro de la bande	présence + absence -	effectifs HD	effectifs F_2	ségrégations HD	ségrégations F_2	χ^2_1 HD	χ^2_1 F_2
22	+	21	28	1/2	3/4	0 NS	2,24 NS
	-	21	15	1/2	1/4		
39	+	21	34	1/2	3/4	0 NS	0,38 NS
	-	21	9	1/2	1/4		
68	+	20	29	1/2	3/4	0,9 NS	1,31 NS
	-	22	14	1/2	1/4		
80	+	6	4	1/4	1/16		
81	-					2,56 NS	--
80	-	36	39	3/4	15/16		
81	+						

b) Utilisations des HD en sélection : Les essais agronomiques classiques montrent qu'il est possible d'obtenir des haploïdes doublés de Blé tendre, ayant des rendements équivalents ou supérieurs à ceux des meilleures variétés actuellement cultivées en France. Ces HD présentent de nombreux avantages, et se révèlent intéressants dans la mesure où ils possèdent :
- une bonne adaptation à des environnements variés, comme cela avait été observé dans le cas du Tabac -OKA et coll 1977 (704)- et du Riz -ANONYMES 1978 (41)- ;
- une bonne stabilité au cours des années -CHEN et LI 1978 (146), CHAO et coll 1981 (135)-, ce qui confirme les observations réalisées chez l'Orge -REINBERGS et coll 1978 (803)- et le Maïs -TING et coll 1980 (993)-. Leur vigueur ne varie pas au cours des générations de multiplication -HU et coll 1979 (432)- ;

- une homogénéité équivalente -BAENZIGER et coll 1980 (61)- ou meilleure -PICARD et coll 1978 (751), HU et HAO 1980 (437)- que celle des variétés parentales, et des coefficients de variation inférieurs à ceux des variétés classiques -ANONYMES 1978 (39)-.

A partir du matériel HD, il est encore possible :
- de fixer des gènes jouant un rôle dans le phénomène d'hétérosis -KASHA et coll 1977 (483)-, et d'obtenir comme nous l'avons observé, des transgressions par rapport aux lignées parentales;
- de réaliser un gain de temps sensible par rapport aux schémas de sélection habituels, pour obtenir la fixité. Ce point est relativement important, dans la mesure où les croisements réalisés en 1982 ne pourront déboucher sur du matériel intéressant avant 1990-95;
- d'obtenir des aneuploïdes à partir de nombreux génotypes, ce qui est d'un grand intérêt pour la génétique de l'espèce -MATTINGLY et COLLINS 1974 (571), NIIZEKI et KITA 1975 (649), NIIZEKI et KITA 1977 (653)-. Dans certains cas, il est même possible d'obtenir des aneuploïdes viables qui n'existaient pas auparavant -MOORE et COLLINS 1982 (610).

Cependant, comme en sélection traditionnelle, le choix du croisement de départ demeure primordial -COLLINS et LEGG 1979 (188)-, puisque nous constatons, en fonction de l'origine génétique, que certains croisements fournissent des HD de très haut niveau, alors que d'autres ne produisent que du matériel HD sans valeur.

D'autre part, les lignées haploïdes doublées, plus homogènes que les familles F_4 encore très hétérozygotes, permettent au sélectionneur d'effectuer un choix sur des lignes de pépinière homogènes, qui peuvent donc être classées avec de moindres risques. Le travail de sélection se trouve facilité, et peut être définitif pour les caractères non soumis aux variations environnementales. Malgré cela, nos résultats indiquent que la sélection en première et seconde génération est imparfaite, même à partir d'HD, puisqu'elle ne permet pas toujours de ne retenir que les meilleures lignées.

Malgré le faible nombre d'origines actuellement testées par

androgenèse, et des effectifs limités d'HD obtenus à partir de chaque origine, nos résultats sont très encourageants. Le matériel HD apporte au sélectionneur des indications très intéressantes sur le travail qu'il réalise. Dans quelque cas, il a été possible d'obtenir d'excellents HD à partir d'origines qui ont été abandonnées en sélection classique. Ceci révèle que ces origines possédaient d'excellentes potentialités, mais qu'elles ont été éliminées par le sélectionneur sur la base de critères subjectifs. Le rôle du sélectionneur est donc important, non seulement lors du choix des croisements qui seront testés en androgenèse, mais également lors de la sélection des HD.

Actuellement, compte tenu de l'importance du croisement, tant en sélection traditionnelle qu'en androgenèse, il est préférable de tester un grand nombre d'origines génétiques plutôt que de rechercher la combinaison rare dans un nombre limité de croisements. Il apparaît, d'une manière générale, que la F_3 est la génération de sélection la plus intéressante pour réaliser l'androgenèse chez le Blé tendre :

- le nombre d'HD obtenu par croisement est en moyenne plus élevé qu'en F_1. Il sera donc possible, pour une quantité de travail déterminée, de tester davantage de croisements;
- le gain de temps est encore important;
- il persiste moins d'anomalies de méïose en F_3 qu'en F_1;
- les recombinaisons efficaces ont été plus nombreuses après 3 méïoses;
- le sélectionneur a pu réaliser deux cycles de sélection qui ont augmenté la fréquence des combinaisons intéressantes;
- même lorsque le nombre d'haploïdes doublés ne sera plus limitant, il ne semble pas envisageable d'un point de vue économique, de créer de très nombreux HD à partir d'une F_1, pour en éliminer très rapidement la quasi totalité.

Ces données confirment les calculs théoriques qui indiquaient, dans certains cas, un avantage à la technique haploïde doublée, lorsqu'elle est réalisée après plusieurs générations de sélection au niveau diploïde -PELLETIER 1979 (738)-.

L'obtention d'HD à partir des F_3 doit être envisagée pour la création variétale directe, mais aussi en sélection récurrente, lorsque le sélectionneur opère un "brassage génétique" pour amé-

liorer son matériel. La technique d'androgenèse offre donc plusieurs possibilités :
- Les HD provenant de matériel très hétérozygote présentent une grande variabilité. Il pourrait être intéressant, chez le Blé tendre, de confirmer qu'un nombre limité de lignées HD constitue, comme chez l'Orge -REINBERGS et coll 1976 (802)- un estimateur fiable de la valeur potentielle du croisement. A ce niveau, la possibilité de créer des lignées agronomiquement intéressantes est déjà une réalité chez l'Orge -SIMPSON et SNAPE 1979 (873), FOROUGHI et coll 1982 (1181)- et le Blé tendre -DE BUYSER et coll 1981 (218)-.
- L'intérêt des HD est manifeste en sélection récurrente (FEYT et PELLETIER 1976 (302), KOTECHA et REINBERG 1980 (515)- , notamment pour mesurer le progrès réaliser lors de chaque cycle.
- A partir de matériel avancé en sélection, quelques HD suffisent pour assurer la fixité requise pour l'inscription au catalogue des variétés.

Par ailleurs, le matériel HD peut faciliter la création de géniteurs :
- La fixation en une seule étape d'un nombre limité de gènes est réalisée plus facilement, puisque les ségrégations sont plus simples : gènes de restauration chez le Riz -LING et coll 1978 (540)- et le Blé, gènes d'incompatibilité avec le Seigle chez le Blé - AL JANABI et PICARD 1981 (7)-.
- Il est possible d'effectuer une introgression à partir d'hybrides intergénériques ou interspécifiques obtenus par voie sexuée -TAKAHASHI 1973 (968), WANG CC et AL 1975 (1055), WOO et coll 1978 (1102), WOO et HUANG 1980 (1103)- ou par fusion de protoplastes -IWAI et coll 1981 (464)-.

Cependant, le facteur limitant demeure le trop faible rendement actuel de la technique. Des progrès sont nécessaires si l'on veut arriver au niveau des résultats obtenus en croisement interspécifique chez l'Orge. A l'avenir, il ne semble pas envisageable de réaliser des essais rendement classiques si le nombre d'haploïdes doublés obtenus chaque année est élevé. Il sera nécessaire de choisir efficacement,de manière précoce, les lignées HD intéressantes qui seront conduites en essais rendement multilocaux. Il pourrait être utile de tester de nouvelles méthodes d'estima-

tion du rendement (micro essai, "hill plot", essais sur lignes,...) à partir du matériel haploïde doublé.

Si l'utilisation des HD représente une voie de création variétale intéressante, il ne faut pas croire que l'androgenèse seule puisse aboutir à des progrès spectaculaires en Amélioration des Plantes. Les résultats ne seront fonction que de la valeur des géniteurs choisis au départ et de l'aptitude à ne retenir que les meilleurs HD en sélection.

Malgré tout, il n'est pas vain d'espérer voir apparaître sur le marché français, durant les prochaines années, une ou plusieurs variétés haploïdes doublées de Blé tendre.

DISCUSSION-CONCLUSION

Depuis 1973, des progrès sensibles ont été réalisés en culture d'anthères in vitro chez le Blé tendre. En ce qui concerne les génotypes les plus efficaces, le rendement de la technique passe d'une plante chlorophyllienne pour plusieurs centaines d'anthères cultivées -CHU C.C. et coll 1973 (167),OUYANG et coll 1973 (714), PICARD et DE BUYSER 1973 (743), WANG et coll 1973 (1054)- à environ 15 ou 20 plantes chlorophylliennes pour 100 anthères -WEI 1982 (1066)-. Cependant, l'obtention des haploïdes demeure le facteur limitant pour l'application de l'androgenèse in vitro, chez le Blé tendre, comme chez la plupart des espèces de grande culture, dans la mesure où il est encore impossible d'obtenir un nombre élevé de plantes chlorophylliennes pour tous les génotypes testés. Les effectifs d'HD obtenus demeurent très inférieurs à ceux observés en androgenèse chez le Tabac et le Riz, ou dans nos programmes de production d'haploïdes par croisement interspécifique chez l'Orge.

D'un point de vue pratique, les programmes de production et d'utilisation des haploïdes doublés de Blé passent par trois étapes successives :

- la culture des plantes mères sur lesquelles seront prélevés les épis. Plusieurs facteurs essentiellement physiologiques modifient le comportement du matériel et sont susceptibles d'influer sur les étapes ultérieures de l'androgenèse. Nous ne disposons que de très peu de données concernant ce point. En effet, si les meilleurs rendements en androgenèse sont réalisés à partir de plantes élevées dans des conditions physiologiques optimales, certaines modifications physiologiques affectent le rendement en embryons.
- l'obtention de plantes fertiles d'origine pollinique. Le choix des épis est une phase importante de la réussite en culture d'anthères in vitro. Le développement embryonnaire à partir des microspores, et la régénération des plantules demeurent à préciser, ainsi que l'origine des plantes albina. L'étude du développement embryonnaire, pour la majorité des espèces, n'a été abordée que d'un point de vue strictement utilitaire. Seuls quelques travaux plus fondamentaux ont été effectués chez le Tabac et le Datura. Cependant de nombreuses informations se rapportent aux dénombre-

ments chromosomiques. Pour notre part, nous pouvons apporter quelques précisions sur le doublement spontané du stock chromosomique.
- L'utilisation des haploïdes doublés en sélection. Cet aspect de l'androgenèse pose plusieurs questions relatives à l'efficacité de la sélection, aux anomalies chromosomiques et au choix du matériel de départ. A l'exception du Tabac, du Riz et à un degré moindre du Blé et de l'Orge, peu de travaux publiés concernent l'intégration de cette technique dans des programmes de sélection, ce qui permet difficilement de s'extraire des schémas classiques.

D'une manière générale, si le nombre d'espèces travaillées en androgenèse a considérablement augmenté depuis 10 ans, peu de travaux ont été consacrés à la compréhension des mécanismes qui président à l'évolution des microspores in vitro. Il nous a semblé intéressant de proposer notre vue générale sur ce que pourrait être l'androgenèse chez le Blé tendre. Nous présentons donc quelques hypothèses qui sont susceptibles d'être infirmées ou confirmées par les faits expérimentaux. Enfin, il nous a paru nécessaire de conclure sur quelques réflexions concernant l'utilisation des haploïdes doublés en sélection.

- Culture des plantes mères : Peu d'études font référence à l'analyse du matériel utilisé pour l'androgenèse. La plupart des auteurs se contentent de décrire les conditions moyennes de température et de lumière que subissent les plantes. En fait, la qualité de ces plantes peut être déterminée dès la génération précédente, durant la phase comprise entre la fécondation et la maturité des semences. La qualité des semences utilisées est donc le premier facteur important à considérer. Ensuite intervient toute la phase concernant le développement de ces graines jusqu'à la plante adulte sur laquelle nous prélevons les épis. Toute variation dans les conditions de culture des plantes mères se répercute sur la qualité des anthères et des microspores. On connaît l'importance de la lumière et de la température, mais on néglige souvent le rôle de la nutrition minérale et des traitements antiparasitaires. Nous pensons que la qualité physiologique du matériel utilisé

pour la culture d'anthères est la condition première de toute réussite en androgenèse. Cependant, il est actuellement difficile de définir ce qu'est la qualité optimale pour l'androgenèse. La vigueur végétative peut en être un facteur. Les différences de qualité permettent d'expliquer les effets journaliers importants que nous observons, de même que les effets épi, épillet, fleur ou anthère. Elles peuvent également expliquer une partie des effets génotypes, dans la mesure où ceux-ci sont cultivés dans des conditions artificielles pour lesquelles ils ne sont pas adaptés. De même, le matériel hybride peut être avantagé par sa vigueur supérieure à celle du matériel homozygote.

La méïose de la plante mère est une étape importante de son développement. Sa régulation est parfaitement contrôlée par de nombreux gènes. Les modifications des conditions de culture peuvent entraîner une modification de cette régulation et par conséquent avoir une incidence sur la qualité des microspores. L'équilibre température-lumière peut jouer un rôle important et peut expliquer les faibles rendements obtenus en androgenèse durant l'hiver : la quantité et la qualité de la lumière reçues par les plantes sont à cette période insuffisantes pour assurer une bonne régulation de la méïose, bien que la température de culture soit bonne. C'est également pour cela que plus les conditions de culture en serre se rapprochent des conditions normales de culture en champ, meilleurs sont les résultats. Il est donc logique de penser qu'il est préférable de ne cultiver que des plantes en champ. L'inconvénient de ce système, appliqué en Chine, est qu'il est réduit singulièrement la période de travail à quelques semaines par an. D'autre part, il impose une définition très rigoureuse du stade de mise en culture, dans la mesure où le matériel cultivé en champ est plus homogène. De meilleures conditions de serre devraient permettre des progrès sensibles.

La période comprise entre la méïose et le prélèvement des anthères nous semble également importante. Elle concerne l'évolution non seulement de la microspore depuis le stade tétrade jusqu'à la première mitose pollinique, mais également celle des tissus somatiques de l'anthère. On sait que les parois de l'anthère subissent de larges transformations biochimiques (migration d'acides aminés, d'auxines). Là encore, toute modification des

régulations à ce niveau entraîne une modification de la qualité des anthères mises en culture, ce qui peut expliquer les différences de rendement observées en androgenèse à l'intérieur d'un génotype.

L'analyse de ces effets plus physiologiques que génétiques rendrait de grands services pour la réussite de l'androgenèse, et plus généralement, des cultures de tissus. Cette étude n'est pas d'un abord facile mais semble être une étape nécessaire pour l'amélioration du rendement en embryons.

Il faut cependant garder à l'esprit que, chez le Blé, nous prélevons une inflorescence, et non une fleur, dont nous ne pouvons connaître que le stade moyen des anthères et des microspores. Il existera toujours à ce niveau une hétérogénéité qui limitera nécessairement les résultats.

- Obtention des plantes d'origine pollinique : Le prélèvement des épis est une étape nécessaire pour l'androgenèse chez le Blé. Il a lieu lorsque les microspores sont uninucléées et proches de la première mitose pollinique. Nous avons montré que leurs noyaux sont en phase G_2 du cycle mitotique. Certains prétraitements (physiques ou chimiques) permettent d'induire des divisions surnuméraires in vivo. Cependant, seule la rupture des corrélations entre la plante et l'anthère, suivie de la culture in vitro, permettent l'obtention de plantes d'origine pollinique. La plupart des prétraitements n'ont pas pour but d'induire le processus, mais seulement d'améliorer son taux de réussite. Ils peuvent agir soit au niveau des microspores en entraînant une meilleure synchronisation, soit au niveau des tissus diploïdes de l'anthère. Dans ce dernier cas, ils peuvent altérer la composition biochimique ou physique et modifier ainsi les processus d'échanges et de et de dégradationsdes tissus en cours de culture.

Actuellement, à l'exception du Datura, du Tabac, du Riz, de l'Aubergine et du Piment, il est nécessaire de cultiver l'anthère contenant les microspores pour aboutir à la formation d'embryons. En début de culture in vitro, il existe une grande variété de formes nucléaires. Une grande partie des structures observées durant la première semaine de culture ne sont que des formes de dégénérescence : c'est le cas des structures multicellulaires qui se forment très rapidement. Une phase de latence semble nécessaire, avant l'induction du véritable processus embryonnaire.

Durant cette phase, les microspores subissent de larges transformations après lesquelles débute l'androgenèse dans les épis efficaces. C'est également durant cette période que se produit une endoreduplication dans certains noyaux, aboutissant ainsi au doublement du stock chromosomique. Il est possible de modifier la fréquence de ce phénomène par l'action de prétraitements au froid et par les milieux de culture.

L'action d'une auxine forte (2,4-D) et d'une concentration élevée en saccharose sont nécessaires chez le Blé pendant la période de latence et d'induction. Le rôle de ces deux substances n'est pas élucidé. Le 2,4-D peut agir sur le déclenchement des mitoses, et le saccharose comme source du carbone nécessaire lors des divisions successives; tous deux modifient en outre la preméabilité cellulaire. Ces métabolites ne sont pas indispensables chez le Tabac au cours de la phase de latence qui peut se dérouler en l'absence de tout métabolite. L'action de la température peut se situer à différents niveaux. Pendant la phase de latence, elle peut modifier les transformations que subissent les microspores mais également les tissus de l'anthère. Durant le processus embryonnaire, elle agit au niveau de la durée du cycle cellulaire. Chez le Blé, il semble qu'une température élevée (30°C) pendant la phase de latence suivie d'une température plus faible (25°C) aboutit à de meilleurs résultats quant à la formation des embryons. De même, la composition du milieu de culture intervient au niveau de la qualité des embryons et permet une plus ou moins grande fréquences de développements embryonnaires pour une très faible fraction des microspores.

Après l'induction des divisions embryonnaires, une étape importante du développement semble être la rupture de l'exine.

L'observation cytologique des anthères après 13 ou 17 jours de culture révèle la présence de nombreux embryons dont la majeure partie dégénèrent. Il nous semblent donc important d'étudier cette période comprise entre le moment qui précède la sortie de l'exine et celui où les embryons apparaissent hors des anthères. Différentes hypothèses sont possibles : les parois de l'anthère en dégénérant produisent des substances toxiques, le milieu de culture s'appauvrit ou au contraire est trop riche pour le développement des embryons. C'est également durant cette période

que se manifestent les fortes différences génotypiques qui se situent chez le Blé au niveau du taux d'avortement.

Cependant toutes ces considérations ne doivent pas faire oublier que les facteurs qui entraînent l'échec en androgenèse ne sont le plus souvent pas liés à la phase de culture in vitro des anthères. En effet, dans nos conditions, il est possible d'obtenir dans les meilleurs cas plus de 20 embryons pour une anthère, plus de 80 embryons pour un épi. Ces seules données indiquent qu'il est possible de faire progresser considérablement le taux de réussite en embryons.

La germination des embryons les mieux structurés produit des plantes similaires aux germinations habituelles. Néanmoins divers types de plantes régénérées apparaissent, aussi est-il préférable de parler de régénération. La régénération, indépendante du taux d'embryons, est possible lorsque les embryons ou les anthères, âgées d'au moins 14 jours, sont cultivées sur un nouveau milieu.

La régénération est liée à la qualité des embryons lors de leur sortie des anthères. Plus les embryons ont une structure normale,plus le taux de régénération est élevé. Cette qualité est déterminée durant l'embryogenèse par les conditions de culture, et par le génotype de la plante mère. L'influence génétique peut se manifester soit directement au niveau des embryons, soit au niveau des tissus nourrices de l'anthère durant le développement embryonnaire.

Les conditions de culture des embryons après leur repiquage ne sont donc pas déterminantes pour la régénération. De fait, diverses conditions permettent effectivement la régénération dès lors que les embryons sont bien structurés. Aussi, les recherches visant à améliorer le taux de régénération devraient se porter sur la structuration des embryons et les conditions qui la favorisent.

Tout au long de notre travail, nous avons parlé d'embryons. Cependant par culture d'anthères il est possible d'obtenir des structures qui se rapprochent plus du "cal", c'est-à-dire d'un tissu non structuré et qui ne présente pas (ou peu) de différentiations. La plupart du temps, nous avons négligé ces types de

structures, puisque nous n'avons jamais observé, dans le cas du Blé tendre, de régénération à partir des cals. Aussi, une autre voie de recherche peut être orientée vers la culture des tissus haploïdes ou diploïdes d'origine pollinique, avec les trois aspects suivants : induction, maintien et régénération. En outre, cals et embryons haploïdes devraient permettre de réaliser une sélection (toxines,...) durant la phase de régénération.

Parmi les plantes régénérées figurent d'une part les plantes vertes, d'autre part les plantes non chlorophylliennes désignées sous le terme impropre d'albinos. Ces dernières plantes ne sont d'aucune utilité dans un travail d'application, aussi nous n'en avons pratiquement pas tenu compte dans nos résultats. Les plantes non chlorophylliennes présentent les mêmes niveaux de ploïdie que les plantes vertes régénérées. Si une partie des albinos sont d'origine génétique, la cause des déficiences chlorophylliennes observées chez les autres plantes devrait être précisée.

Dans le cas du Blé, parmi les plantes chlorophylliennes, 90% sont haploïdes ou diploïdes. L'origine pollinique de ces plantes a pu être établie. Les plantes diploïdes spontanées résultent d'un doublement précoce du stock chromosomique dans la microspore, par suite d'une endoreduplication avant la première division embryonnaire.

Les analyses cytologiques ont permis de mettre en évidence l'existence d'anomalies chromosomiques numériques et structurales chez certaines plantes régénérées. Contrairement à d'autres espèces, le Blé tolère un grand nombre de modifications chromosomiques (nulli, mono,...). Une partie de ces anomalies a son origine dans le matériel de départ. En effet les sélectionneurs utilisent de plus en plus, pour la création variétale, des génotypes qui diffèrent dans leurs structures chromosomiques. Les plantes hybrides peuvent alors présenter des anomalies de méïose qui se traduisent par la formation de gamètes anormaux. Une autre partie est liée à la culture in vitro. Des anomalies mitotiques sont fréquentes en culture de tissus (cassure de chromosomes, pertes, misdivision,...). Nous pensons cependant qu'il existe une interaction génotype-technique. Certains génotypes pouvant dans les

conditions de la culture in vitro, exprimer une instabilité caryotypique. La culture de tissus pourrait modifier l'efficacité des systèmes de réparation.

Des anomalies chromosomiques peuvent également être induites lors du traitement des plantes haploïdes à la colchicine.

En définitive, l'androgenèse in vitro est un processus de développement embryonnaire de la microspore qui aboutit à la formation de plantes viables. Cependant le rendement actuel de la technique est encore trop faible et est limité par une perte importante dans le matériel régénéré :
- régénération de plantes "albina",
- reprise en terre,
- doublement à la colchicine,
- présence d'anomalies chromosomiques.

Nous pensons qu'il est possible de faire progresser sensiblement le rendement androgénétique. Pour obtenir ce résultat, les recherches sur les points suivants devraient à notre sens être développées :
- contrôle des conditions de culture des plantes mères, pour un meilleur choix des épis efficaces;
- recherche des causes de l'avortement des jeunes embryons entre le stade 10-20 cellules et la sortie de l'anthère;
- détermination de critères de qualité des embryons.

Ces trois points nécessitent de définir les conditions qui déterminent l'effet inducteur des anthères, de connaître avec plus de précision le déroulement du phénomène, et de déterminer les conditions optimales de réussite.

L'obtention de plantes haploïdes et diploïdes homozygotes à partir de matériel hybride présente beaucoup d'intérêt. Dans le cadre de notre travail, nous avons envisagé cet aspect sous l'angle de leur utilisation dans des schémas de sélection pour la création variétale. Nous pensons que les remarques que nous fairons peuvent s'appliquer quelle que soit la technique d'obtention des haploïdes doublés.

- utilisation des haploïdes doublés en sélection : L'un des inté-

rêts présentés par les haploïdes doublés réside dans leur utilisation éventuelle en sélection. La possibilité d'obtenir des lignées parfaitement fixées a retenu l'attention des sélectionneurs. En effet, l'une des causes de refus lors de l'inscription au catalogue des nouvelles variétés est la non-fixité du matériel.

Cependant, les haploïdes doublés ont souvent été décriés dans la littérature. Certains chercheurs estimaient que l'homozygotie totale est préjudiciable à la plante. Si dans quelques cas les haploïdes doublés ont semblé moins vigoureux, c'est que l'hétérozygotie résiduelle était élevée chez le matériel de départ. La possibilité d'obtenir des variétés agronomiquement intéressantes, issues d'haploïdes doublés, est réelle et a été démontrée chez de nombreuses espèces, telles que le Maïs, le Tabac, le Riz, le Blé et l'Orge.

Le matériel haploïde doublé présente de nombreuses qualités. Son homogénéité est meilleure que celle du matériel classique, et il est stable au cours des générations successives d'autofécondation. Les haploïdes doublés obtenus à partir des générations précoces de sélection peuvent révéler une grande variabilité entre eux, si la base du croisement est large. Il est possible comme en sélection classique d'obtenir des lignées supérieures en rendement aux variétés parentales ou aux variétés utilisées comme témoins dans les essais. Les haploïdes doublés obtenus à partir de générations avancées permettent de fixer le matériel mais ne révèlent que peu de variabilité. Le gain de temps que permet le matériel haploïde doublé est appréciable, surtout lorsque la technique est utilisée sur des plantes peu avancées en sélection (F_1, F_2 ou F_3).

Un autre point qu'il faut signaler consiste en une meilleure efficacité de la sélection. Le choix qu'effectue le sélectionneur est facilité par l'utilisation de lignées haploïdes doublées : le jugement en pépinière porte sur des lignes, et non sur des plantes individuelles. Cependant si l'utilisation d'haploïdes doublés en sélection venait à se généraliser, il se poserait rapidement un problème de test de la valeur de ces plantes. Il ne semble pas concevable de pouvoir placer en essai tous les HD, aussi faudrait-il trouver de nouveaux tests permettant de ne retenir que les meilleurs dès la première ou la seconde génération de multiplication en champ. Il serait par exemple intéressant de connaître

le nombre minimal de lignes de pépinière nécessaires pour avoir une bonne estimation du rendement et qui permette de retenir les meilleurs HD avec un faible pourcentage d'erreurs.

L'utilisation des haploïdes doublés rend nécessaires un certain nombre de précautions, notamment en ce qui concerne l'isolement des plantes afin d'éviter tout risque d'allofécondation, particulièrement chez certaines lignées qui possèdent une tendance naturelle à l'allogamie.

Il est un problème que l'utilisation des HD n'est pas certaine de résoudre : c'est celui des variétés dites "infixables". Il existe en France de plus en plus de variétés instables, malgré de nombreuses générations d'autofécondation contrôlée. Nous pensons que de telles instabilités peuvent exister chez des plantes homozygotes vraies. Souvent ces instabilités sont d'origine génétique et se manifestent lors de la méiose des plantes. L'irrégularité de la méiose peut avoir deux conséquences : la première est la formation de gamètes non haploïdes qui aboutit à des plantes aneuploïdes, la seconde est la stérilité partielle des fleurs qui peut dans certains cas favoriser l'allogamie. Dans ces deux cas, les descendances sont hétérogènes. Il semble que certains gènes de régulation de la méiose soient associés à des gènes contrôlant des caractères intéressants pour le sélectionneur, tels que les gènes de nanisme. Bien des problèmes de fixité se rencontrent dans les lignées possédant ces gènes.

Il ne faut pas non plus s'imaginer que l'utilisation des HD peut amener des progrès spectaculaires en Amélioration des plantes. La valeur des HD dépend uniquement des potentialités génétiques contenues dans le croisement de départ. En sélection classique, l'ensemble des sélectionneurs français réalise plusieurs milliers de croisements chaque année, cependant le nombre de variétés inscrites est très faible et dépasse rarement 10 par an. Il en sera de même avec les haploïdes doublés, pour lesquels il sera nécessaire de tester un grand nombre de combinaisons. De même, il n'est guère possible de définir à l'avance l'effectif optimal d'HD indispensable pour extraire une large gamme de variabilité à partir du matériel de départ. Cet effectif théorique dépend à la fois de la variabilité génétique introduite dans le croisement, de la génération de sélection et du schéma de sélection.

Compte tenu de nos résultats actuels, l'utilisation des HD peut s'envisager de plusieurs façons :

- La fixation d'un petit nombre de gènes dans un nouveau génotype peut être réalisée en une seule étape et avec un effectif limité.
- l'introgression de gènes ou de fragments de chromosomes d'espèces voisines est plus aisée, dans la mesure où de nombreuses combinaisons nouvelles ne sont pas contresélectionnées comme elles le sont en autofécondation.
- L'utilisation des HD en sélection récurrente peut sembler prometteuse pour mesurer le progrès réalisé lors de chaque cycle. L'utilisation de géniteurs très éloignés devrait conduire à produire les HD non depuis la F_1, mais après une ou deux générations en régime d'autofécondation afin d'augmenter les possibilités de recombinaisons.
- A partir de F_5 ou F_6, quelques HD seulement suffisent pour fixer la lignée recherchée.
- Une utilisation des HD rarement envisagée concerne les possibilités de test de la valeur potentielle des F_1, par un nombre limité d'HD afin de sélectionner les croisements les plus intéressants pour la création variétale.
- Si, en théorie, la génération F_1 semble le niveau le plus intéressant pour extraire les haploïdes doublés, de nombreux inconvénients existent à son niveau. Le nombre de recombinaisons est plus faible. La fréquence des anomalies chromosomiques est plus élevée. De plus, au niveau F_1, il est nécessaire d'obtenir beaucoup d'HD, pour finalement n'en retenir qu'un petit nombre. Aussi, il nous semble plus efficace d'utiliser l'androgenèse ou toute autre technique d'obtention des HD, sur du matériel ayant subi deux générations d'autofécondation. Les possibilités de recombinaisons sont plus nombreuses et le sélectionneur a pu effectuer un tri important dans son matériel. A ce niveau, il est possible de tester un plus grand nombre des croisements retenus en sélection. Une des solutions les plus efficaces consisterait à tester un grand nombre de F_3 et n'extraire, pour chacune d'elles, que quelques haploïdes doublés.

Ainsi, l'utilisation des haploïdes doublés en sélection modifie quelque peu les schémas traditionnels. Elle doit notamment amener le sélectionneur à réfléchir sur de nouveaux tests pour juger du matériel fourni par ces nouvelles techniques.

ANNEXE 1 : Origines génétiques du matériel mis en culture.

énération e sélection		R.A.G.T.	DESPREZ	MOMONT TOURNEUR BENOIST
F_1		900	D_1-D_2-D_3-D_4-D_5-D_6-D_7-D_8-D_9-(775)	
F_2			01-(34)-(74)-81-100-79030-79037-79060-R_1-R_2	T_1
F_3	G	619-630-635-640-663-665-719		$MH_{2,3,4,5,6}$
	B		78102-78106-78131	
F_4	G	(426)-(444)-445-457-472-618-620-625-644-648-654-660-669-704-7207		MH_1 B_2
	B		78026-78035-78036-78093-78099-78124-78128-78197	
F_5	G	46-50-(56)-(98)-141-(341)-350-409-414-423-458		
	B			T_2
F_6	G	(192)-(200)-212-305		
	B		23-(26)-28-(31)-54-	
F_7	B		(771)-(772)-(773)	
F_8	G			B_1
BC_1		487-(598)-(610)-(723)892		

B : Bulk
G : Généalogique
( ) : Origine abandonnée en sélection traditionnelle
123 : Origine sur cytoplasme timopheevi

ANNEXE 2 : Origines génétiques particulières :

Variétés utiliséees comme géniteurs	Origines génétiques testées en culture d'anthères
AURORA	B_1
BESOSTAIA	635-663-719-625-660-704-98-141-423-212-598-610-723
CLEMENT	444-457-423-487-610
COURTOT	669-34-74-100-78036-78099-78128 23-26-28-31-54
ROAZON	900-640-654-7207-723-MH_1-MH_2-MH_3-D_9

ANNEXE 3 : Composition des milieux de culture des anthères.

Milieux	B	BG	N_6	B_4	P	PM	PG_3	G_3S	G_1	G_2	G_3	G_4
Composition	(743)	(213)	(168)	(213)								
Macro-éléments Miller (591)	+	+	-	1/2	-	-	-	-	-	-	-	-
N_6 (168)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P.d.t. (171)	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
idem sans KNO_3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Micro-éléments Miller (591)	+	+	-	1/2	-	-	-	-	-	-	-	-
N_6 (168)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vitamines Fujii (172)	+	+	-	1/2	-	-	-	-	-	-	-	-
N_6 (168)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
thiamine (mg/l)	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1
Fer EDTA 10^{-4} M	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
glutamine (mg/l)	-	0,2	-	-	0,2	0,5 ou 1	1	1	0,2	0,5	1	2
asparagine (mg/l)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-
2,4-D (mg/l)	2	2	2	2	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
kinétine (mg/l)	-	-	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
saccharose (g/l)	120	120	80	90	100	100	100	100	100	100	100	100
agar (g/l)	8	8	8	8	7	7	-	-	-	-	-	-
agarose (g/l)	-	-	-	-	-	-	6	6	-	-	-	-
extrait de pomme de terre (ml/l) (27)	-	-	-	200	100	100	100	-	-	-	-	-
pH	5,9	5,9	5,8	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9

ANNEXE 4 : Composition des solutions de macroéléments, microéléments et vitamines (mg/l).

Composants		Miller (591)	N_6 (168)	anthère (171)	P.d.t. anthère modifié	embryon (171)
Macroéléments	KNO_3	1000	2830	1000	-	900
	NH_4NO_3	1000	-	-	-	850
	$Ca(NO_3)_2,4H_2O$	500	-	100	100	-
	KH_2PO_4	300	400	200	200	100
	$MgSO_4,7H_2O$	71,5	185	125	125	200
	KCl	65	-	35	35	-
	$(NH_4)_2SO_4$	-	463	100	100	-
	$CaCl_2,2H_2O$	-	166	-	-	200
Microéléments	$MnSO_4\ 4H_2O$	4,9	4,4	-	-	-
	$ZnSO_4\ 7H_2O$	2,7	1,5	-	-	-
	H_3BO_3	1,6	1,6	-	-	-
	KI	0,75	0,8	-	-	-

		Fujii (172)	N_6 (168)
Vitamines	meso inositol	100	-
	glycine	20	2
	pyridoxineHCl	5	0,5
	thiamine HCl	1	1
	ac.nicotinique	5	0,5

ANNEXE 5 : Composition des milieux de culture des embryons.

Milieux / Composition		R_8 (743)	RP (171)	RG	RG1	RZ1	RZ_2	RD	RDA
Macro-éléments	Miller (591)	+	-	-	-	-	-	-	-
	P.d.t. (171)	-	+	+	+	+	+	+	+
Micro-éléments	Miller (591)	+	-	-	-	-	-	-	-
Vitamines	Fujii (172)	+	-	-	-	-	-	-	-
	thiamine (mg/l)	-	1	1	1	1	1	1	1
Fer EDTA 10^{-4} M		1/2	+	+	+	+	+	+	+
glutamine (mg/l)		-	-	50	50	50	150	-	-
2,4-D (mg/l)		-	-	-	-	-	-	-	1
AIA (mg/l)		1	-	-	-	-	1	-	-
zéatine (mg/l)		-	-	-	-	0,05	0,05	-	-
saccharose (g/l)		20	30	30	30	30	30	30	30
agar (g/l)		7	7	7	-	-	-	-	-
agarose (g/l)		-	-	-	-	-	6	6	6
extrait de pomme de terre (ml/l)		-	50	50	50	50	50	50	50
pH		5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9

ANNEXE 6 : Résultats obtenus à partir des cultures d'anthères en 1976.

Origines génétiques	46	50	56	98	141	23	26	26	31	54
Anthères mises en culture (1)	11670	29436	38282	16805	31020	34633	40074	36265	32478	26499
Embryons obtenus(2)	107	226	416	243	374	255	285	44	273	107
2/1 (%)	0,9	0,8	1,1	1,5	1,2	0,7	0,7	0,1	0,8	0,4
Plantes vertes régénérées (3)	4	4	36	5	9	6	4	0	9	14
3/2 (%)	3,7	1,7	8,6	2,0	2,4	2,3	1,4	0	3,2	13,0
Lignées HD en première multiplication	1	1	19	1	3	2	2	-	8	6
Lignées HD en seconde multiplication	1	1	19	1	3	2	1	-	8	5
Lignées HD en essai rendement en 1979	1	-	17	1	1	-	-	-	-	-
Lignées HD en essai rendement en 1980	1	1	4	1	1	1	1	-	5	5
Lignées HD en essai rendement en 1981	1	-	1	-	-	-	-	-	3	-
Lignées HD en essai rendement en 1982	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-

ANNEXE 7 : Résultats obtenus à partir des cultures d'anthères en 1977.

Origines génétiques	487	192	200	212	305	01	34	74	81	100
Anthères mises en culture (1)	24480	22149	26746	26971	26040	29886	36332	36225	41182	43062
Embryons obtenus(2)	199	19	502	147	137	153	423	123	440	199
2/1 (%)	0,8	0,1	1,9	0,6	0,5	0,5	1,2	0,3	1,1	0,5
Plantes vertes régénérées (3)	10	0	125	12	13	37	20	25	37	7
3/2 (%)	5,0	0	24,8	8,1	9,4	24,1	4,7	20,3	8,4	3,5
Lignées HD en première multiplication	5	-	53	6	3	10	14	11	14	1
Lignées HD en seconde multiplication	3	-	-	4	2	7	12	10	10	1
Lignées HD en essai rendement en 1980	2	-	-	3	1	4	7	5	2	1
Lignées HD en essai rendement en 1981	1	-	-	2	1	-	7	1	2	-
Lignées HD en essai rendement en 1982	1	-	-	1	1	-	2	-	-	-
Lignées HD déposées à l'inscription en 1981	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-

ANNEXE 8 : Résultats obtenus à partir des cultures d'anthères en 1978.

Origines génétiques	771	772	773	775	341	350	598	610
Anthères mises en culture (1)	35392	44322	60835	63438	51934	75888	29907	44691
Embryons obtenus (2)	44	235	326	168	71	437	190	691
2/1 (%)	0,1	0,5	0,5	0,3	0,1	0,6	0,6	1,5
Plantes vertes régénérées (3)	0	4	29	11	4	8	13	36
3/2 (%)	0	1,7	8,9	6,5	5,6	1,8	6,8	5,2
Lignées HD en première multiplication	-	3	14	7	0	7	6	21
Lignées HD en seconde multiplication	-	-	-	4	-	3	1	6
Lignées HD en essai rendement en 1981	-	-	-	4	-	2	-	3
Lignées HD en essai rendement en 1982	-	-	-	-	-	1	-	2

ANNEXE 9 : Résultats obtenus à partir des cultures d'anthères en 1979.

Origines génétiques	D_1	D_2	D_3	D_4	D_5	409	414	426	723	MH_1
Anthères mises en culture (1)	49266	43819	26382	39556	43572	32978	39529	25053	34825	56821
Embryons obtenus (2)	533	475	252	194	298	673	85	504	746	493
2/1 (%)	1,1	1,1	1,0	0,5	0,7	2,0	0,2	2,0	2,1	0,9
Plantes vertes régénérées (3)	64	13	21	7	18	59	11	52	39	31
3/2 (%)	12,0	2,7	8,3	3,6	6,0	8,7	12,9	10,3	5,2	6,2
Lignées HD en première multiplication	41	9	10	5	12	39	8	41	23	23
Lignées HD en seconde multiplication	20	2	4	3	4	-	3	4	6	23
Lignées HD en essai rendement en 1982	7	1	4	2	2	-	3	4	4	-

ANNEXE 10 : Résultats obtenus à partir des cultures d'anthères en 1980.

Origines génétiques	D_6	D_7	D_8	D_9	423	444	445	457
Anthères mises en culture (1)	40800	44480	52800	44800	13040	22960	24080	24400
Embryons obtenus(2)	1248	1000	1080	1861	576	1509	370	285
2/1 (%)	3,1	2,2	2,0	4,2	4,4	6,6	1,5	1,2
Plantes vertes régénérées (3)	29	8	11	20	65	164	41	74
3/2 (%)	2,3	0,8	1,0	1,1	11,3	10,9	11,1	26,0
Lignées HD en première multiplication	21	4	10	14	27	51	36	59

ANNEXE 10 : Résultats obtenus à partir des cultures d'anthères en 1980 (suite).

Origines génétiques	472	892	900	MH_2	T_1	T_2
Anthères mises en culture (1)	27520	37440	48160	45440	19040	22400
Embryons obtenus (2)	601	1136	878	805	240	2020
2/1 (%)	2,2	3,0	1,8	1,8	1,3	9,0
Plantes vertes régénérées (3)	3	35	16	20	19	35
3/2 (%)	0,5	3,1	1,8	2,5	7,9	1,7
Lignées HD en première multiplication	2	18	4	15	13	25

ANNEXE 11 : Résultats obtenus à partir des cultures d'anthères en 1981.

Origines génétiques	78026	78035	78036	78093	78099	78124	78128	78197	MH_3
Anthères mises en culture (1)	13380	22800	24900	16260	20040	16260	16380	15180	19260
Embryons obtenus(2)	116	516	267	159	310	399	533	258	834
2/1 (%)	0,9	2,3	1,9	1,0	1,6	2,5	3,3	1,7	4,3
Plantes vertes régénérées (3)	3	27	4	22	7	24	17	10	63
3/2 (%)	2,6	5,2	1,5	13,8	2,2	6,0	3,2	3,9	7,6
Lignées HD en première multiplication	3	21	2	15	6	11	10	5	41

ANNEXE 11 : Résultats obtenus à partir des cultures d'anthères en 1981(suite).

Origines génétiques	MH_4	458	619	630	635	640	663	665	719
Anthères mises en culture (1)	20220	23040	16680	21720	15000	14580	21300	20940	14760
Embryons obtenus(2)	286	528	319	490	352	198	233	44	222
2/1 (%)	1,4	2,3	1,9	2,3	2,3	1,4	1,1	0,2	1,5
Plantes vertes régénérées (3)	23	28	25	28	5	11	21	1	9
3/2 (%)	8,0	5,3	7,8	5,7	1,4	5,6	9,0	2,3	4,1
Lignées HD en première multiplication	15	20	9	13	2	4	12	1	5

ANNEXE 12 : Résultats obtenus à partir des cultures d'anthères en 1982.

Origines génétiques	B_1	B_2	618	620	625	644	648	654
Anthères mises en culture (1)	15300	16680	8760	6720	13980	10740	12000	8940
Embryons obtenus(2)	1280	145	31	71	493	24	345	208
2/1 (%)	8,4	0,9	0,4	1,1	3,5	0,2	2,9	2,3
Plantes vertes régénérées (3)	232	8	1	3	14	1	1	0
3/2 (%)	18,1	5,5	3,2	4,2	2,8	4,2	0,3	0

Origines génétiques	660	669	704	7207	MH_5	MH_6	78102	78106
Anthères mises en culture (1)	10260	10320	12540	11280	14500	18600	14400	10260
Embryons obtenus(2)	1303	406	112	340	326	466	304	180
2/1 (%)	12,7	3,9	0,9	3,0	2,3	2,5	2,1	1,8
Plantes vertes régénérées (3)	6	11	4	2	21	7	5	6
3/2 (%)	0,5	2,7	3,6	0,6	6,4	1,5	1,6	3,3

ANNEXE 12 : Résultats obtenus à partir des cultures d'anthères en 1982(suite)

Origines génétiques	78131	79030	79037	79060	R_1	R_2
Anthères mises en culture (1)	9540	11640	9840	13260	12360	14280
Embryons obtenus(2)	75	803	127	167	35	47
2/1 (%)	0,8	6,9	1,3	1,3	0,3	0,3
Plantes vertes régénérées (3)	8	6	8	12	3	2
3/2 (%)	10,7	0,8	6,3	7,2	8,6	4,3

ANNEXE 13 : Effet saisonnier .

1976, milieu B

Mois	Nov	Dec	J	F	M	A	Mai	J
NA	25407	2005	7295	14154	46528	24609	7215	49637
NE	160	14	69	85	439	394	108	291
%	0,6	0,7	0,9	0,6	0,9	1,6	1,5	0,6

1980, milieu P

Période	15/1-15/2	22/2-12/3	18/3-9/4	11/4-19/5	21/5-30/6
Nombre d'épis cultivés	278	580	1376	1440	306
Nombre d'épis embryogènes	106	231	565	822	126
%	38,1	39,8	41,1	57,1	41,2

ANNEXE 14 : Distribution du nombre d'anthères embryogènes par épi, en fonction du génotype

Génotype	Nombre d'épis observés	Nombre d'anthères embryogènes par épi																		% d'épis efficaces
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	18	20	27	
648	181	93,9	3,9	0,6	1,6															6,1
625	234	35,5	25,2	18,4	10,7	5,4	2,1	1,3	1,3											64,5
660	174	11,5	18,4	24,7	16,1	7,5	8,6	2,3	2,3	1,1	2,3	2,3		1,7		0,6		0,6		88,5
B_1	74	17,6	16,2	12,2	10,8	8,1		1,4	5,4	6,7	4,0	4,0	1,4	1,4	1,4	4,0	2,7	1,4	1,4	82,4

ANNEXE 15 : Distribution du nombre d'embryons par anthère embryogène, en fonction du pourcentage d'anthères embryogènes.

Pourcentage d'anthères embryogènes	Nombre d'embryons par anthère embryogène																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	 21
0,2 %	77,1	15,1	3,8	1,0	1,0	1,0			1,0									
1 %	64,5	20,1	7,7	2,7	1,7	1,5	0,7				0,5	0,3		0,3				
7 %	52,1	14,1	12,9	5,5	4,3	1,2	2,5	1,8	2,5						1,2	0,6	0,6	0,6

HENRY Yves en collaboration avec Jacques DE BUYSER

RESUME :

Cette thèse présente l'étude de l'androgenèse in vitro et son utilisation dans de programmes de sélection chez le Blé tendre. La technique consiste à cultiver les anthères sur milieu gélosé pour obtenir des embryons qui se développent ensuite en plantes.

De nombreux facteurs sont susceptibles d'intervenir sur le taux de réussite. Les plantes chlorophylliennes ou albinos obtenues peuvent être haploides, diploides ou aneuploides.

L' étude des descendances des haploides doublés révèle l'homogénéité et la stabilité de ces plantes. Leur valeur agronomique qui dépend essentiellement des parents est comparable à celle des lignées obtenues par sélection classique.

La technique d'androgenèse, malgré un rendement encore faible, peut permettre d'obtenir rapidement de nouvelles variétés de Blé.

MOTS CLES :

Androgenèse in vitro, Blé, haploïde doublé, sélection.

SUJET : Androgenèse chez le Blé tendre - Analyse théorique et Utilisation en sélection.